

**Ermittlung der Bindspezifitäten für das canine MHC-Klasse-I-Allel  
DLA-88\*03201 sowie vergleichende Betrachtung viraler und zellulä-  
rer Liganden von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01**

von

**Christian Marius Schreitmüller**



# **Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der  
Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Ermittlung der Bindspezifitäten für das canine MHC-Klasse-I-Allel  
DLA-88\*03201 sowie vergleichende Betrachtung viraler und zellulä-  
rer Liganden von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01**

von

**Christian Marius Schreitmüller**

aus Esslingen

München, 2018



**Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von:**

Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Angefertigt am:** Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie,  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen

**Mentor:** Prof. Dr. Oliver Planz



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Dušan Palić

**Tag der Promotion: 10.02.2018**





**Meinen Eltern Christa und Helmut**



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungen .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Immunsystem.....	1
1.1.1 Angeborenes Immunsystem .....	1
1.1.2 Adaptives Immunsystem.....	2
1.1.2.1 T-Lymphozyten (T-Zellen) .....	3
1.1.2.2 B-Lymphozyten (B-Zellen) .....	4
1.1.2.3 Gedächtniszellen .....	5
1.2 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex .....	6
1.2.1 MHC-Klasse-I .....	6
1.2.2 Antigen-Prozessierung .....	8
1.2.3 MHC des Hundes .....	10
1.2.4 Vergleichende Onkologie beim Hund .....	11
1.2.5 Therapie caniner Tumorerkrankungen .....	12
1.2.6 Tübingen Approach .....	13
1.3 Das Influenzavirus .....	16
1.3.1 Einteilung und Aufbau.....	16
1.3.2 Influenzavirusinfektion.....	18
1.3.3 Infektionsfähigkeit von Zellen/Geweben .....	22
1.3.4 Evolution der Influenzaviren .....	23
1.3.4.1 Antigendrift .....	23
1.3.4.2 Antigenshift.....	24
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>25</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1 Material.....	27
3.1.1 Antikörper .....	27

3.1.2	Enzyme .....	27
3.1.3	Chemikalien .....	28
3.1.4	Geräte .....	30
3.1.5	Verbrauchsmaterialien .....	33
3.1.6	Puffer, Medien, Lösungen .....	34
3.1.7	Zelllinien .....	38
3.1.8	Software .....	39
3.1.9	Virus .....	39
3.2	Methoden .....	40
3.2.1	Zellbiologische Methoden .....	40
3.2.1.1	Zellkultur .....	40
3.2.1.1.1	Suspensionszellen .....	40
3.2.1.1.2	Adhärenent wachsende Zellen .....	41
3.2.1.2	Zellzahlbestimmung .....	41
3.2.1.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	42
3.2.1.4	Transfektion .....	43
3.2.1.4.1	Linearisierung .....	43
3.2.1.4.2	Lipofektion .....	45
3.2.1.4.3	Elektroporation .....	47
3.2.1.5	Reklonierung .....	48
3.2.1.6	FACS-Färbung zur Bestimmung der MHC-Expression .....	48
3.2.1.7	Peptidbindungsassay .....	49
3.2.1.8	Peptidsynthese .....	51
3.2.2	Arbeiten mit Influenzaviren .....	51
3.2.2.1	Virusanzucht .....	51
3.2.2.2	Bestimmung des Virustiters (Avicel Plaque Assay) .....	52
3.2.2.2.1	Verdünnung und Infektion .....	52
3.2.2.2.2	Fixierung .....	54
3.2.2.2.3	Färbung .....	54
3.2.2.2.4	Auswertung .....	55
3.2.2.3	Intrazelluläre FACS-Färbung .....	57

3.2.2.3.1	Untersuchung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88*50101-Zellen.....	57
3.2.2.3.2	Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88*50101-Zellen ohne Trypsin.....	58
3.2.3	Analytische Methoden .....	61
3.2.3.1	Durchflusszytometrie .....	61
3.2.3.1.1	Durchführung .....	62
3.2.3.2	Isolation von viralen/zellulären DLA- und HLA-Liganden .....	66
3.2.3.2.1	Vorbereitung Infektionsansatz.....	66
3.2.3.2.2	Vorbereitung nicht infizierter Zellen.....	67
3.2.3.2.3	Vorbereitung der Säulenmatrix für die Affinitätschromatographie.....	67
3.2.3.2.4	Affinitätschromatographie.....	68
3.2.3.2.5	Elution und Ultrafiltration .....	69
3.2.3.2.6	Vakuumzentrifugation .....	69
3.2.3.2.7	Reinigung und Entsalzung .....	70
3.2.3.3	Massenspektrometrie .....	70
3.2.3.3.1	Vorbereitung für die Massenspektrometrie .....	70
3.2.3.3.2	LC-MS/MS.....	71
3.2.3.3.3	LTQ Orbitrap XL .....	71
3.2.3.3.4	Orbitrap Fusion Lumos.....	73
3.2.3.3.5	Peptididentifizierung.....	73
3.2.3.3.6	HLA-Annotation.....	74
3.2.3.3.7	Bestimmung der Bindungsaffinität .....	75
3.2.3.3.8	Gibbs-Clustering .....	75
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>77</b>
4.1	Teil 1: Bestimmung der Bindspezifitäten für das Allel DLA-88*03201 .....	77
4.1.1	Transfektion und Bestimmung der DLA-Expression .....	77
4.1.1.1	C1R-Zellen mit DLA-88*03201 .....	78
4.1.1.2	K562-Zellen mit DLA-88*03201 .....	84
4.1.2	Immunaффinitätschromatographie.....	88

4.2 Teil 2.1: Isolation viraler und zellulärer DLA-88*50101- und HLA-A*02:01- Liganden .....	103
4.2.1 Bestimmung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88*50101-Zellen.....	103
4.2.2 Ergebnisse der Virusanzucht .....	105
4.2.3 Infektion von C1R-DLA-88*50101-Zellen ohne Trypsin .....	106
4.2.4 Isolation viraler und zellulärer DLA-88*50101- und HLA-A*02:01- Liganden .....	111
4.3 Bestätigung des Bindemotives für DLA-88*50101 .....	119
4.4 Peptidbindungsassay.....	123
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>133</b>
5.1 Auswahl von Zelllinien zur Transfektion von caninen MHC-Allelen .....	133
5.2 Vergleich der Methoden zur Transfektion des caninen Allels DLA-88*03201 .....	135
5.3 Bestimmung der Bindspezifitäten für das Allel DLA-88*03201.....	138
5.4 Bestimmung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88*50101-Zellen .....	141
5.5 Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88*50101-Zellen ohne die Verwendung von Trypsin .....	142
5.6 Vergleich zellulärer und viraler HLA-A*02:01- und DLA-88*50101-Liganden.....	144
5.7 Identifikation von viralen DLA-88*50101-T-Zell-Epitopen .....	145
5.8 Untersuchung der Bindungsfähigkeit auf DLA-88*50101 und HLA-A*02:01 .....	146
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>151</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>153</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>167</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls. ....	7
Abbildung 2:	Darstellung der Antigenprozessierung über MHC-Klasse-I-Moleküle.....	9
Abbildung 3:	Der Tübingen Approach .....	15
Abbildung 4:	Schematische Darstellung eines Influenza-A-Virus. ....	18
Abbildung 5:	Replikationszyklus des Influenza-A-Virus. ....	20
Abbildung 6:	Neubauer-improved-Zählkammer Quelle: in Anlehnung an [133].....	42
Abbildung 7:	Darstellung der Transfektion von DNA mittels Lipofektion.....	45
Abbildung 8:	Pipettierschema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe. ....	53
Abbildung 9:	Scan einer 96 well-Titerplatte nach Durchführung eines Avicelplaqueassays. ....	55
Abbildung 10:	Beispielhafte Auszählung und Markierung der Foci je Vertiefung an Hand der 96 well-Titerplatte aus Abbildung 9.....	56
Abbildung 11:	Funktionsweise eines Durchflusszytometers. ....	61
Abbildung 12:	Exemplarische Darstellung eines Dot Plots von C1R-DLA-88*03201- Zellen.....	64
Abbildung 13:	Exemplarische Darstellung der Histogramme ausgewählter K562-DLA- 88*03201- und C1R-DLA-88*50101-Zellen zur Bestimmung der DLA- Expression. ....	65
Abbildung 14:	Darstellung eines LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometers. ....	72
Abbildung 15:	Histogramme der mittels Elektroporation transfizierten C1R-DLA- 88*03201-Zellen. ....	79
Abbildung 16:	Histogramme der C1R-DLA-88*03201-Klone der dritten Limiting Dilution. ....	82
Abbildung 17:	Histogramme der mit DLA-88*03201 transfizierten K562-Zellen. ....	86
Abbildung 18:	Histogramm des K562-DLA-88*03201-Klons D6, der auf Grund seiner DLA-Expression zur Immunaффinitätschromatographie weiterverwendet wurde. ....	87
Abbildung 19:	Längenverteilung der Peptide aus den verschiedenen Experimenten.....	91
Abbildung 20:	Rekonstruierte Bindemotive des ersten und zweiten Experiments.....	93
Abbildung 21:	Vergleichende Analyse von HLA-B*35:03- und CLA-C*04:01- zugeordneten Peptiden mit den identifizierten Peptiden des ersten und zweiten Experiments mit C1R-DLA-88*03201.....	95

Abbildung 22:	Prozentuale Verteilung der Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen der Octamere, Nonamere und Decamere der ausgewählten Peptide aller drei Experimente. ....	97
Abbildung 23:	Prozentualer Anteil der Peptide mit sauren oder polaren Seitenketten am C-Terminus an der Peptidgesamtzahl einer Länge. ....	99
Abbildung 24:	Häufigkeiten der Aminosäuren an Positionen innerhalb der Sequenzen der gebiasteten Octamere, Nonamere und Decamere der ausgewählten Peptide aller drei Experimente. ....	101
Abbildung 25:	Vermutliches Bindemotiv für das Allel DLA-88*03201. Dargestellt sind die Häufigkeiten der Aminosäuren an verschiedenen Sequenzpositionen der ausgewählten Nonamere aller drei DLA-88*03201-Experimente. ....	102
Abbildung 26:	Histogramme zur Bestimmung der Infektionsrate von C1R-DLA-88*50101-Zellen mit dem Influenzavirus RB1. ....	104
Abbildung 27:	Festlegung des Bereichs der für die Bestimmung der Infektionsrate relevant ist. ....	108
Abbildung 28:	Histogramme zur Überprüfung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88*50101-Zellen mit dem Influenzavirus RB1 ohne Verwendung von Trypsin. ....	110
Abbildung 29:	Vergleich der Quellproteine der MHC-Klasse-I-Liganden von DLA-88*50101 und HLA-A*02:01. ....	114
Abbildung 30:	Vergleich der MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide von DLA-88*50101 und HLA-A*02:01. ....	115
Abbildung 31:	Vergleichende Analyse der Peptidfrequenzen von DLA-88*50101 und HLA-A*02:01. ....	116
Abbildung 32:	Vergleichende Darstellung der Abundanzen der DLA-88*50101- und HLA-A*02:01-Liganden. ....	117
Abbildung 33:	Längenverteilung aller DLA-88*50101 Peptide aus den MHC-Immunpräzipitationen mit nicht infizierten C1R-DLA-88*50101-Zellen. ...	120
Abbildung 34:	Vergleichende Darstellung der Häufigkeiten von Aminosäuren an verschiedenen Sequenzpositionen. ....	121
Abbildung 35:	Abgleich der vermutlichen Bindemotive für das Allel DLA-88*50101. ....	122
Abbildung 36:	Bestätigung des experimentell bestimmten DLA-Liganden YINDKGKEVL (A) und des HLA-Liganden GILGFVFTL (B). ....	123
Abbildung 37:	Exemplarische Darstellung der Dot Plots und Histogramme des ersten Peptidbindungsassays. ....	126
Abbildung 38:	Normalisierte Fluoreszenzintensitäten der Peptidbindungsversuche .....	132



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Antikörper.....	27
Tabelle 2:	verwendete Enzyme .....	27
Tabelle 3:	verwendete Chemikalien .....	28
Tabelle 4:	verwendete Geräte .....	30
Tabelle 5:	verwendete Verbrauchsmaterialien .....	33
Tabelle 6:	verwendete Puffer, Medien und Lösungen .....	34
Tabelle 7:	verwendete Zelllinien .....	38
Tabelle 8:	verwendete Software .....	39
Tabelle 9:	Darstellung der synthetischen Peptide, die für den Peptidbindungsassay verwendet wurden. ....	50
Tabelle 10:	Bestimmung des Virustiters.....	57
Tabelle 11:	Einstellungen zur Bestimmung der MHC-Expression und bei der intrazellulären FACS-Färbung. ....	63
Tabelle 12:	Einstellungen für den Peptidbindungsassay.....	63
Tabelle 13:	Verwendete Filterkriterien zur Peptididentifizierung .....	74
Tabelle 14:	Mediane der mittels Elektroporation transfizierten C1R-DLA- 88*03201-Zellen. ....	80
Tabelle 15:	Mediane der C1R-DLA-88*03201-Klone der dritten Limiting Dilution.....	83
Tabelle 16:	Median des K562-DLA-88*03201-Klons D6, der zur Immunaffinitätschromatographie selektiert wurde.....	88
Tabelle 17:	Übersicht der durchgeführten Immunaffinitätschromatographien.....	88
Tabelle 18:	Übersicht über die HLA-assoziierten und vermutlich DLA-88*03201- assoziierten Peptide pro Experiment.....	89
Tabelle 19:	Übersicht über die übereinstimmenden potentiellen DLA-88*03201- Liganden im Vergleich der durchgeführten Experimente. ....	90
Tabelle 20:	Publizierte Bindemotive für die Allele HLA-B*35:03 und HLA-C*04:01. ....	94
Tabelle 21:	Anzahl an Peptiden verschiedener Längen mit saurem oder polarem C- Terminus aus der Gesamtzahl aller ausgewählten Peptide. ....	99
Tabelle 22:	Virustiter der Viruskonzentrate und Angabe der jeweils verfügbaren Menge in Milliliter.....	106

Tabelle 23:	Übersicht über die Mittelwerte der Infektionsraten aus drei technischen Replikaten pro Experiment mit zugehöriger Standardabweichung. ....	111
Tabelle 24:	Vergleichende Darstellung der identifizierten Peptide nach Isolierung mittels MHC-Immunaффinitätschromatographie (Experiment mit nicht infizierten Zellen). ....	112
Tabelle 25:	Vergleichende Darstellung der identifizierten Peptide nach Isolierung mittels MHC-Immunaффinitätschromatographie (Experiment mit infizierten Zellen). ....	112
Tabelle 26:	Übersicht über die HLA-assoziierten und vermutlich DLA-assoziierten Peptide pro Experiment mit nicht infizierten Zellen. ....	113
Tabelle 27:	Übersicht über die HLA-assoziierten und vermutlich DLA-assoziierten Peptide pro Experiment mit infizierten Zellen. ....	114
Tabelle 28:	MHC-Klasse-I-Peptide (DLA-88*50101) aus Influenza-spezifischen Proteinen (MHC-Präzipitation mit C1R-DLA-88*50101-Zellen).....	118
Tabelle 29:	MHC-Klasse-I-Peptide (HLA-A*02:01) aus Influenza-spezifischen Proteinen (MHC-Präzipitation mit JY-Zellen).....	119
Tabelle 30:	Peptide, die zur Analyse der Bindungsfähigkeit auf HLA-A*02:01 und DLA-88*50101 herangezogen wurden mit Angabe der zugehörigen MHC-Bindungsscores. ....	125
Tabelle 31:	Mediane der Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen der jeweiligen Peptidbindungsversuche. ....	130

# Abkürzungen

%	Prozent
%-rank	prozentuale Rangstufe
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
AST+V	Alanin, Serin, Threonin und Valin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHAPS	<i>3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propane-sulfonate</i>
CHE	Schweiz
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
cRNA	kodierende RNA
D	Asparaginsäure
DEU	Deutschland
DLA	<i>dog leucocyte antigen</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNK	Dänemark
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	<i>endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
Exp.	Experiment
F	Phenylalanin
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FFU	<i>focus forming units</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
HO	Hämagglutinin

---

H1	Untereinheit des Hämagglutinin
H2	Untereinheit des Hämagglutinin
HLA	<i>human leucocyte antigen</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
I	Isoleucin
IAV	Influenzaviren Typ A
IBV	Influenzaviren Typ B
ICV	Influenzaviren Typ C
ILV	Isoleucin, Leucin und Valin
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
JP	Japan
L	Liter
L	Leucin
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
M	molar
MCA-400	<i>Monoclonal Antibody 400</i>
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min.	Minuten
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n. a.	<i>not available</i> (nicht verfügbar)
P	Prolin
p. a.	<i>pro analysi</i> (für analytische Zwecke)
PA	saures Polymeraseprotein
PB1	Polymeraseprotein 1
PB2	Polymeraseprotein 2
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PLK	Peptid-Ladekomplex
POL	Polen
Pvul	<i>Proteus vulgaris</i>

---

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SA	Sialinsäure
Si	Scheininfection
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STIKO	Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut
SWE	Schweden
T	Tyroxin
TAA	tumorassoziierte Antigene
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
Th	Thomson
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helferzellen
V	Valin
WHO	<i>World Health Organization</i>
YOPIs	Personengruppe aus Menschen mit den Eigenschaften <i>young, old, pregnant, immunocompromised</i>
z. B.	zum Beispiel
β <sub>2</sub> m	β <sub>2</sub> -Mikroglobulin



# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem

Innerhalb eines Organismus schützt das Immunsystem mit Hilfe von verschiedenen biologischen Strukturen und Prozessen den Körper vor Pathogenen wie Viren, Bakterien oder Parasiten, aber auch vor Krebszellen. Neben dieser Tätigkeit ist das Immunsystem zudem mit der Aufgabe betraut, körpereigene ausgediente oder tote Zellen zu entfernen. Es ist hierfür von essentieller Bedeutung, dass das Immunsystem also nicht nur in der Lage ist, eine ausreichende Immunantwort gegen eindringende Pathogene zu erzeugen, sondern es muss darüber hinaus auch zwischen körpereigenen und körperfremden unterscheiden können. Einen Großteil seiner Arbeit leistet es in der Regel im Verborgenen, so dass die bedeutende Rolle des Immunsystems in der Abwehr von Krankheitserregern häufig erst zu Tage tritt, wenn Störungen in seiner Funktion vorliegen. Hierbei kann eine zu geringe Aktivität des Immunsystems zum Beispiel schwerwiegende Infektionskrankheiten begünstigen, wohingegen eine übersteigerte Aktivität Allergien oder Autoimmunerkrankungen zur Folge haben kann.

Die Abwehr von Pathogenen verläuft meistens nach einem mehrschichtigen Muster. Als äußerer Schutzschild des Körpers dienen zunächst physikalische Barrieren, die das Eindringen von Krankheitserregern verhindern. Werden diese überwunden, wartet als Nächstes das angeborene Immunsystem mit seiner unmittelbaren, aber dafür unspezifischen Immunantwort auf. Erst wenn dieses ebenfalls umgangen wird, kommt in der Folge schließlich das adaptive, spezifische Immunsystem zum Zug.

### 1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt quasi die erste Verteidigungslinie des Körpers dar. Spezialisierte Epithelzellen, die über Bindeproteine (die sogenannten „*tight junctions*“ [1]) miteinander verbunden sind, bilden auf der Körperoberfläche zunächst eine äußere Barriere gegen Erreger aller Art und grenzen somit die extrazelluläre Umgebung vom Inneren des Organismus ab [2]. Während die trockenen Epithelzellschichten der Haut mit ihrem sauren pH-Wert zumeist eine relativ standfeste Hürde gegen eindringende Mikroorganismen darstellen, bedürfen die Epithelien der Atemwege, des Magen-Darm-Traktes und des Urogeni-

taltraktes zusätzlicher Schutzmechanismen, da sie häufig die Eintrittspforte für Erreger darstellen. Daher verfügen diese, als Ergänzung zu der für Epithelzellen üblichen Barrierefunktion, über Schleimstoffe, die für den Abtransport von Pathogenen verantwortlich sind [3, 4] und häufig auch über antimikrobiell und biochemisch wirksame Stoffe wie z. B. Lysozym [5] im Speichel und in der Tränenflüssigkeit oder Defensinen [6] im Respirations- und Verdauungstrakt. Darüber hinaus werden viele Epithelzellen von einer bakteriellen Normalflora besiedelt, die mit pathogenen Mikroorganismen um Nahrung und Lebensraum konkurriert und zum Teil auch in der Lage ist, antimikrobielle Stoffe zu erzeugen, um die Ansiedelung von anderen, unerwünschten Bakterien zu erschweren [7].

Wenn Pathogene diese erste Hürde überwinden konnten, wie das z. B. bei Wunden oder Verbrennungen der Fall ist, treffen sie auf weitere zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Zu Beginn handelt es sich hierbei meistens um Makrophagen, die zu den Fresszellen gehören und die innerhalb des Körpers unermüdlich die Epithelien „patrouillieren“ auf der Suche [8] nach eingedrungenen Erregern, die sie anhand von spezifischen Oberflächenrezeptoren, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren [9], erkennen können. Wenn sie einen Eindringling entdeckt haben, zerstören sie diesen durch Phagozytose und geben Zytokine und andere Botenstoffe ab, mit denen sie zum einen eine lokale Entzündungsreaktion im Gewebe auslösen und zum anderen weitere Zellen auf den Plan rufen. Zu diesen Zellen gehören vor allem die neutrophilen Granulozyten und die natürlichen Killerzellen, die gemeinsam ebenfalls maßgeblich an der Beseitigung von Pathogenen beteiligt sind, aber auch basophile und eosinophile Granulozyten. Neben der Aufgabe als Fresszellen besitzen neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zudem die Fähigkeit, Bestandteile der von ihnen aufgenommenen Pathogene mit Hilfe von MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und T-Zellen zu aktivieren. Sie werden daher auch als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet. Vor allem die dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems stimulieren somit die adaptive Immunantwort [10] und stellen auf diese Weise eine Verknüpfung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar.

### **1.1.2 Adaptives Immunsystem**

Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive Immunsystem zwar spezifischer in seiner Wirkungsweise, braucht jedoch dafür aber auch eine längere Anlaufzeit.



Hauptbestandteile des adaptiven Immunsystems stellen die B- und T-Lymphozyten dar, die zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) gezählt werden. Da diese nur über eine relativ begrenzte Lebensdauer verfügen, wird im Körper kontinuierlich für deren Neubildung aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gesorgt.

#### 1.1.2.1 T-Lymphozyten (T-Zellen)

Nach der Bildung im Knochenmark wandern die T-Lymphozyten-Vorläufer in den Thymus [11]. Dort angekommen, vermehren sie sich durch Zellteilung und der Aufbau ihrer T-Zell-Rezeptoren wird eingeleitet, mit denen sie später befähigt sind, normale und veränderte Zellen voneinander zu unterscheiden. Ein Großteil der Vorläuferzellen bildet hierbei T-Zell-Rezeptoren aus, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette bestehen. Nur ein kleiner Teil besitzt einen T-Zell-Rezeptor aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette [12], wobei letztere dem angeborenen Immunsystem zugeordnet wird. Im weiteren Verlauf der T-Zell-Reifung im Thymus findet eine positive und eine negative Selektion der Vorläuferzellen statt, d. h. es werden nur jene Zellen nicht aussortiert und dem Tod durch Apoptose preisgegeben, die eine moderate Bindung mit MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen (MHC: *major histocompatibility complex*) eingehen. Dadurch wird sichergestellt, dass weder T-Zellen, die keine MHC-Moleküle erkennen können, noch jene, die eine zu starke Bindung mit körpereigenen MHC-Peptiden eingehen, in die Körperperipherie entlassen werden [13]. Nach abgeschlossenem Reifungsprozess verlassen die naiven T-Zellen (naiv, da sie noch nicht mit Antigen in Kontakt gekommen sind) den Thymus und gelangen über die Blutbahn in die lymphatischen Gewebe [14].

Dort binden die naiven T-Zellen mit ihren T-Zell-Rezeptoren an MHC-Moleküle von antigenpräsentierenden Zellen. In Kombination mit einer Bindung von B7-Proteinen der antigenpräsentierenden Zellen an CD28-Ko-Rezeptoren der T-Zelle und der Ausschüttung von Zytokinen durch die antigenpräsentierenden Zellen kommt es schließlich zur Aktivierung der naiven T-Zellen. Hierbei proliferieren diese und differenzieren sich entweder zu zytotoxischen  $CD8^+$ -T-Zellen oder zu  $CD4^+$ -T-Helferzellen. Dieser Vorgang wird auch als „*priming*“ bezeichnet.  $CD8^+$ -T-Zellen besitzen die Fähigkeit, mit ihren T-Zell-Rezeptoren MHC-Klasse-I-Moleküle verschiedenster Körperzellen auf fremde Antigene hin zu untersuchen und diese, wenn sie fündig geworden sind (wie z. B. bei infizierten, entarteten oder dysfunktionalen Zellen), durch die Ausschüttung von Perforinen und Granzymen zu zerstören. Auf Grund dieser Tatsache sind zytotoxische T-Zellen für die Immuntherapie verschiedener Krebserkrankungen von beson-

derem Interesse, so dass mittlerweile viele immunologische Strategien auf einer zielgerichteten, antitumoralen  $CD8^+$ -T-Zell-Antwort beruhen [15].  $CD4^+$ -T-Zellen hingegen tragen auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren, die spezifisch sind für Antigene, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen zur Schau gestellt werden [16]. Es gibt verschiedene Arten von T-Helferzellen, z. B.  $T_H1$ -T-Zellen, die Phagozyten, natürliche Killerzellen und  $CD8^+$ -T-Zellen aktivieren und stimulieren und außerdem lokale Entzündungsreaktionen steigern. Außerdem  $T_H2$ -T-Zellen, die gemeinsam mit  $T_H1$ -T-Zellen B-Zellen aktivieren und anregen, Antikörper zu bilden [17], sowie – als wichtige ausgleichende Komponente des Immunsystems – sogenannte regulatorische T-Helferzellen. Diese inhibieren die Aktivierung und Proliferation anderer T-Zellen und halten somit die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Antigenen aufrecht.

### 1.1.2.2 B-Lymphozyten (B-Zellen)

B-Zellen leisten im Körper einen wichtigen Beitrag zur humoralen Immunantwort des adaptiven Immunsystems. Während ihrer Reifung im Knochenmark bilden sie IgM-Antikörper auf ihrer Oberfläche aus, die sogenannten B-Zell-Rezeptoren, die, wie bei den T-Zellen, einer positiven und einer negativen Selektion [18] unterzogen werden. Infolgedessen schreiten ebenfalls nur jene Zellen mit ihrer Reifung voran, die einen funktionstüchtigen Antikörper auf ihrer Oberfläche besitzen, der nicht an körpereigene Antigene bindet. Anschließend wandern die unreifen B-Zellen mit dem Blutstrom in die Milz. Dort tritt neben IgM nun auch IgD auf ihrer Oberfläche in Erscheinung, wodurch die Reifung der B-Lymphozyten abgeschlossen ist [19].

Diese reifen, aber noch naiven B-Lymphozyten können auf zwei verschiedene Weisen aktiviert werden, nämlich mit und ohne die Zuhilfenahme von T-Helferzellen [20]. In letzterem Fall müssen die B-Zellen zunächst Antigene wie z. B. Viren aus dem Blut oder der Lymphe mit ihrem B-Zellrezeptor binden. In der Folge werden diese in die Zelle aufgenommen, in kleinere Bestandteile zerlegt und schließlich wieder als Peptide auf den MHC-Klasse-II-Molekülen der Zelloberfläche präsentiert, als sogenannte Liganden. Im nächsten Schritt binden nun T-Zellen mit ihrem T-Zell-Rezeptor an die MHC-Klasse-II-Moleküle der B-Zellen. Die präsentierten Liganden auf beiden MHC-Molekülen müssen hierbei vom gleichen Antigen stammen, aber nicht identisch sein. Unter Verwendung von ko-stimulierenden Molekülen und Zytoki-

nen regt die T-Zelle anschließend die B-Zelle an, zu proliferieren und sich zu Antikörperbildenden Plasmazellen zu differenzieren [2].

Plasmazellen sind in der Lage, Antikörper, auch Immunglobuline genannt, zu sezernieren. Antikörper sind Proteine, die aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten bestehen, die jeweils wiederum in variable und konstante Bereiche unterteilt werden können. Die variablen Bereiche der Antikörper bilden hierbei die Stellen, an die ein spezifisches Antigen gebunden werden kann. Der konstante Teil der schweren Kette der Antikörper hingegen ist für die Funktion des Immunglobulins zuständig und erlaubt, je nach Beschaffenheit, eine Einteilung in verschiedene Klassen (Isotypen) von Immunglobulinen. Wirbeltiere besitzen zumeist fünf verschiedene Immunglobulin-Isotypen: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM [21]. Antikörper verfügen über verschiedene Funktionen im Körper. Zum einen binden sie an Pathogene im Körper, neutralisieren sie dadurch und kennzeichnen sie für den Abbau durch Fresszellen. Zum anderen sind sie imstande, das Komplementsystem zu aktivieren.

#### **1.1.2.3 Gedächtniszellen**

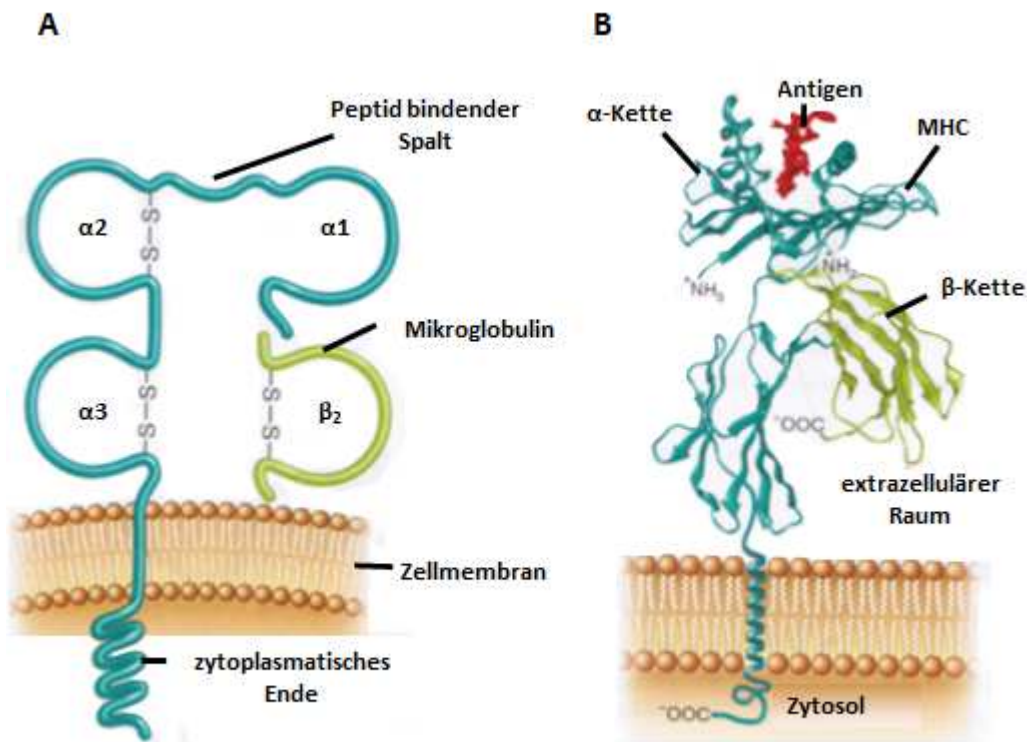
Bei jeder Immunreaktion differenzieren sich einige B- und T-Lymphozyten zu sogenannten Gedächtniszellen, die sich über Jahre hinweg an ein Antigen „erinnern“. Somit kann später bei erneutem Antigenkontakt schneller eine effektive Immunantwort ausgelöst werden und der Ausbruch einer Erkrankung häufig verhindert bzw. der Krankheitsverlauf abgeschwächt werden [22].

## 1.2 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex

Innerhalb der DNA bildet eine Gruppe von Genen einen Abschnitt, der als Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) bezeichnet wird. Dieser Genabschnitt kodiert für bestimmte Glykoproteine, die später einen großen Teil der sogenannten MHC-Moleküle auf der Oberfläche von Zellen bilden. Mit Hilfe der MHC-vermittelten Präsentation von Peptiden können zum einen T-Zellen aktiviert werden, zum anderen können aber auch T-Zellen und andere Zellen des Immunsystems gesunde von infizierten bzw. veränderten Zellen differenzieren. Auf Grund der Tatsache, dass MHC-Moleküle zuerst auf der Oberfläche von Leukozyten entdeckt wurden, bezeichnet man jene des Menschen auch als HLA-Moleküle (HLA: *human leukocyte antigen*). Es lassen sich zwei verschiedene Arten von antigenpräsentierenden MHC-Molekülen unterscheiden: MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle [23].

### 1.2.1 MHC-Klasse-I

MHC-Klasse-I-Moleküle stellen Proteinkomplexe dar, die auf der Oberfläche aller kernhaltigen Säugetierzellen exprimiert werden. Sie setzen sich jeweils aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, der schweren  $\alpha$ -Kette und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) sowie einem gebundenen Peptid, dem Ligand, zusammen. Die  $\alpha$ -Kette ist in der Zellmembran fixiert und kann in eine  $\alpha 1$ -, eine  $\alpha 2$ - und eine  $\alpha 3$ -Domäne unterteilt werden, an die das  $\beta_2$ -Mikroglobulin nicht kovalent gebunden ist [24]. Durch die Bildung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblattstrukturen formen die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen die Peptid bindende Furche [25].



**Abbildung 1: Struktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls.**

- (A) Schematische Darstellung eines MHC-Klasse-I-Moleküls, bestehend aus einer in der Zellmembran verankerten schweren  $\alpha$ -Kette und einer leichten Kette, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin. Die  $\alpha$ -Kette kann in eine  $\alpha 1$ -, eine  $\alpha 2$ - und eine  $\alpha 3$ -Domäne unterteilt werden. Die  $\alpha 1$ - und die  $\alpha 2$ -Domäne bilden den Peptid bindenden Spalt, in dem das Antigen gebunden wird.
- (B) Bändermodell eines MHC-Klasse-I-Moleküls mit gebundenem Antigen.

Quelle: in Anlehnung an[26].

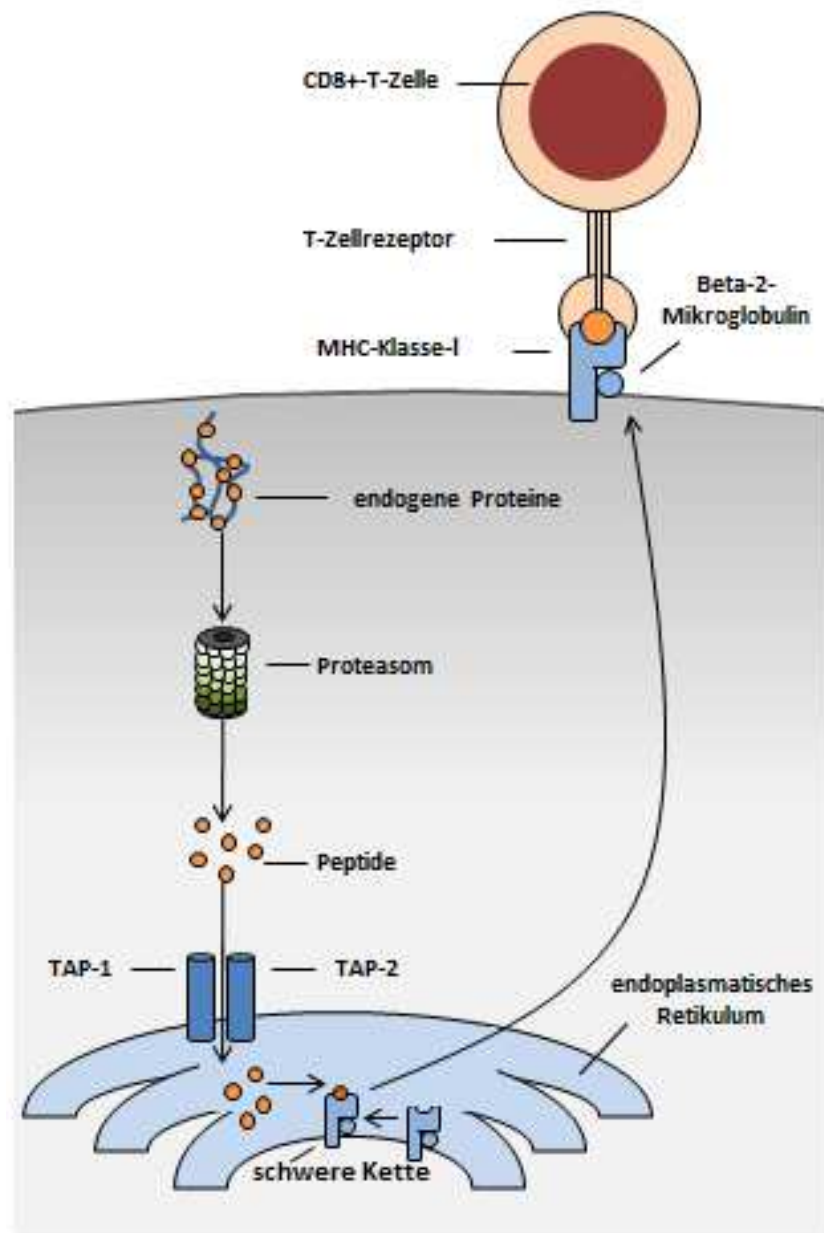
Diese beherbergt sechs verschiedene Bindungstaschen (A–F), die mit den Seitenketten des gebundenen Peptids interagieren können und es somit auf der Oberfläche des MHC-Moleküls fixieren [27] (Abbildung 1, A und B). Dabei werden die Liganden meistens in gestreckter Form gebunden, wodurch sich innerhalb der Bindungsgrube nur Platz für Peptide mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren bietet [28]. Abhängig von der Art des MHC-Allels bestehen Differenzen in den Aminosäuresequenzen der Bindungstaschen und somit auch in den allelspezifischen Aminosäuren, den sogenannten Ankerpositionen, über die das Peptid-antigen mit dem MHC-Molekül verbunden ist. Aus der Gesamtheit der Ankerpositionen wie-

derum ist es möglich, ein Bindemotiv für einen bestimmten MHC-Allotyp zu definieren [29, 30] und unter Verwendung von Online-Programmen wie SYFPEITHI [31] vorausszusagen, welche Abschnitte eines Proteins auf einem bestimmten MHC-Molekül binden können.

### 1.2.2 Antigen-Prozessierung

Peptide, die auf der Oberfläche von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, stellen hauptsächlich Teilstücke von endogenen Proteinen dar, die durch eine Reihe von intrazellulären Prozessen selektiert und zugeschnitten, also prozessiert wurden. Bei den endogenen Proteinen kann es sich sowohl um zelleigene Proteine handeln als auch um Proteine, die als Folge einer viralen Infektion oder malignen Transformation synthetisiert wurden [32]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über die Vorgänge, die an der Antigenprozessierung für MHC-Klasse-I-Molekülen beteiligt sind.

Die Prozessierung von Antigenen beginnt mit der Markierung von intrazellulären Proteinen, die degradiert werden sollen, mittels einer Kette aus Ubiquitin-Molekülen. Diese Ubiquitinierung wird durch drei verschiedene ATP-abhängige Enzyme katalysiert, einem Ubiquitin-aktivierendem Enzym, einem Ubiquitin-konjugierendem Enzym und einer Ubiquitin-Protein-Ligase. In der Folge können die so markierten Proteine durch einen ATP-abhängigen Proteasekomplex, durch das 26S-Proteasom, weiter verarbeitet werden [33, 34] (Abbildung 2). Dieses befindet sich im Zytosol der Zelle und besteht jeweils aus einer katalytisch wirksamen 20S-Untereinheit und zwei regulatorischen 19S-Untereinheiten. Letztgenannte können Ubiquitin-markierte Proteine erkennen, entfalten und deubiquinieren an das proteolytische Zentrum [35, 36] weiterleiten. Dieses befindet sich innerhalb des 20S-Teils des Proteasomes, welches durch vier aneinander gelagerte Ringstrukturen gebildet wird, nämlich durch zwei äußere aus  $\alpha$ 1- bis  $\alpha$ 7- und zwei innere aus  $\beta$ 1- bis  $\beta$ 7-Untereinheiten. Hiervon besitzen die  $\beta$ <sub>1</sub>-,  $\beta$ <sub>2</sub>- und  $\beta$ <sub>5</sub>-Untereinheiten jeweils unterschiedliche Proteaseaktivität, und zwar eine Chymotrypsin-ähnliche (Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren), eine Trypsin-ähnliche (Spaltung nach basischen Aminosäuren) und eine Caspase-ähnliche (Spaltung nach sauren Aminosäuren) Aktivität [37-39]. Im Falle einer viralen Infektion oder Entzündungsreaktion können die proteolytischen Untereinheiten durch Interferon- $\gamma$ -induzierbare  $\beta$ -Untereinheiten (LMP-2, LMP-7 und MECL-1) ersetzt werden [40], wodurch das Proteasom die Möglichkeit besitzt, die Effizienz seiner Tätigkeit heraufzusetzen.



**Abbildung 2:** Darstellung der Antigenprozessierung über MHC-Klasse-I-Moleküle.

Körpereigene oder körperfremde Proteine werden mittels Ubiquitinierung markiert und anschließend durch das Proteasom, einem multikatalytischen Proteasekomplex, in Peptide gespalten. Die neu gebildeten Peptide werden dann über den TAP, bestehend aus den Untereinheiten TAP 1 und TAP 2, selektiv in das endoplasmatische Retikulum transportiert und dort auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Die beladenen MHC-Klasse-I-Komplexe werden schließlich über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und präsentieren dort ihr endogenes Antigen den zirkulierenden zytotoxischen T-Zellen. Diese können sich somit ein Bild vom Zustand der Zellen machen und in der Folge infizierte oder maligne Zellen eliminieren.

Quelle: in Anlehnung an [41].

Die auf diesem Weg neu entstandene Version des Proteasomes wird als Immunoproteasom bezeichnet [42]. Durch die proteolytische Aktivität des Proteasomes erfahren die zukünftigen MHC-Klasse-I-Liganden bereits ihre endgültige, C-terminale Zuschneidung und besitzen zu diesem Zeitpunkt eine Länge zwischen drei und 25 Aminosäuren [43].

Während einige Peptide nun bereits in ihrer endgültigen Form vorliegen, müssen andere noch einer N-terminalen Kürzung unterzogen werden. Zuständig hierfür sind Peptidasen im Zytosol und im endoplasmatischen Retikulum (ER) [44], wie zum Beispiel das Protein ERAAP (*endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*) [45]. Der Transport der im Zytosol generierten Peptide wird über den TAP-Komplex (TAP: *transporter associated with antigen processing*) vermittelt, welcher aus zwei Untereinheiten (TAP1 und TAP2) gebildet wird [46]. Bezüglich der von ihm transportierten Peptide besitzt der TAP-Komplex eine gewisse Selektivität, die speziesspezifisch variieren kann. Während der murinen TAP-Komplex hauptsächlich eine Vorliebe für Peptide mit hydrophobem C-terminalem Ende aufweist, präferiert der humane TAP-Komplex Peptide mit sowohl hydrophoben als auch basischen C-terminalen Enden [47-49].

Dem TAP-Komplex wird nicht nur der Transport von Peptiden zugeschrieben, sondern er stellt gleichzeitig auch das Kernstück des sogenannten Peptid-Ladekomplex (PLK) innerhalb des ER dar. Neben dem TAP-Komplex gehören zu dem MHC-Klasse-I-Molekül und die Chaperone Tapasin, ERp57 und Calreticulin zum PLK [50]. Die Aufgabe der letztgenannten besteht in der Stabilisierung der anfangs unbeladenen MHC-Komplexe und der Gewährleistung, dass nur Peptide mit ausreichender Affinität gebunden werden [51-53]. Erst wenn die MHC-Moleküle vollständig zusammengesetzt sind, also aus den drei Komponenten Peptid, schwere Kette und leichte Kette bestehen, lösen sie sich von den Chaperonen und können mit Hilfe des Golgi-Apparats an die Zelloberfläche transportiert werden. MHC-Moleküle, die fehlgefaltet sind und somit kein Peptidantigen oder  $\beta_2m$  binden können, werden zurück ins Zytosol befördert und dort durch das Proteasom abgebaut [54, 55].

### 1.2.3 MHC des Hundes

Der Hund besitzt, genauso wie der Mensch, im Vergleich zu anderen Tierarten eine relativ große innerartliche Vielfalt. Auf Grund dieser Tatsache wurden Hunde in der Vergangenheit häufig als Tiermodell in der Wissenschaft verwendet. Untersuchungen bezüglich der Ursache



von Abstoßungsreaktionen bei Organ- und hämatopoetischen Stammzelltransplantationen beim Menschen gaben in der Vergangenheit den Anreiz, das MHC-Molekül des Hundes, das als DLA (*dog leucocyte antigen*) bezeichnet wird, genauer zu untersuchen [56]. Während beim Menschen der Bereich, der die Information für MHC-Moleküle beinhaltet, auf Chromosom 6 lokalisiert ist, befindet sich jener beim Hund hauptsächlich auf Chromosom 12 [57]. Ende der 1980er Jahre wurden die MHC-Gene des Hundes in DLA-Klasse I und DLA-Klasse II unterteilt [58]. Außerdem war im Anschluss auch die erste Sequenzierung eines DLA-Klasse-I-Genes von Erfolg gekrönt. Interessanterweise wurden hierbei große Ähnlichkeiten mit einem HLA-Gen festgestellt [59]. Die MHC-Klasse-I-Gene des Hundes setzen sich aus acht Exons und sieben Introns zusammen, wobei das erste Exon den genetischen Code für das Startpeptid beinhaltet. Des Weiteren liefert das zweite Exon die genetische Information für die  $\alpha 1$ -, das dritte die für die  $\alpha 2$ - sowie das vierte die für die  $\alpha 3$ -Domäne. Als verbleibende Bestandteile des MHC-Moleküls wird die transmembrane Region durch das fünfte bis siebte Exon kodiert und der innerhalb der Zelle gelegene Teil durch das achte Exon [60]. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten sieben verschiedene Genloci, die für DLA-Klasse-I-Moleküle kodieren, bestimmt werden, von denen aber nur vier, DLA-12, -64, -79 und -88 funktionale MHC-Moleküle liefern [61]. Während DLA-79 einen relativ geringen Grad an Polymorphismus aufweist und abweichend von den anderen drei DLA-Genloci auf Chromosom 18 kodiert wird [62], zeichnet sich DLA-88 als MHC-Klasse-Ia-Molekül mit bisher 72 verschiedenen Allelen aus [63-65]. Dieser hohe Polymorphismus macht gerade das DLA-88 Gen besonders interessant für die Transplantationsforschung und ist auch auf Grund dieser Eigenschaft ein wichtiger Bestandteil dieser Doktorarbeit [62].

#### 1.2.4 Vergleichende Onkologie beim Hund

Der Forschungszweig der vergleichenden Onkologie zeichnet sich durch die Verknüpfung von Untersuchungsergebnissen bezüglich Krebserkrankungen aus der Veterinärmedizin mit bisher bestehendem Wissen aus der Humanmedizin [66] aus. Zu Beginn wurden vor allem Mäuse als Modelltiere verwendet, um die biologischen Hintergründe von humanen Krebserkrankungen zu verstehen. Jedoch hat sich gezeigt, dass Daten, die mit Hilfe von Mausmodellen generiert wurden, teilweise nur bedingt aussagekräftig für die humane Krebsforschung sind [67]. Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass Tumoren in Mausmodellen zu meist induziert werden, also nicht spontan auftreten, wie das beim Menschen der Fall ist.

Außerdem sind die verwendeten Mausstämme in ihrer genetischen Vielfalt ausgesprochen limitiert im Vergleich zum Polymorphismus in der natürlichen Menschenpopulation [68]. In den letzten Jahren hat daher die Bedeutung von Haustieren für die vergleichende Onkologie rasant zugenommen, wobei insbesondere der Hund in den Fokus des Interesses gerückt ist [68, 69]. Besagtes liegt in den bemerkenswerten Ähnlichkeiten von caninen Krebserkrankungen zu humanen in puncto Histopathologie, Biologie, Vielfältigkeit und dem Ansprechen auf therapeutische Interventionen begründet [70]. Außerdem sind viele Hunde auf Grund eines engen zwischenartlichen Zusammenlebens in der heutigen Zeit weitestgehend den denselben Bedingungen sowie den gleichen umweltlichen Einflüssen wie der Mensch ausgesetzt, wodurch sie zur Ermittlung möglicher krebsauslösender Risikofaktoren als besonders prädestiniert erscheinen [71, 72]. Somit treiben neue Erkenntnisse bezüglich der Ätiologie und der Therapie caniner Krebserkrankungen nicht nur die Veterinärmedizin voran, sondern ermöglichen vermutlich auch einen Wissenszuwachs in der humanen Onkologie.

### **1.2.5 Therapie caniner Tumorerkrankungen**

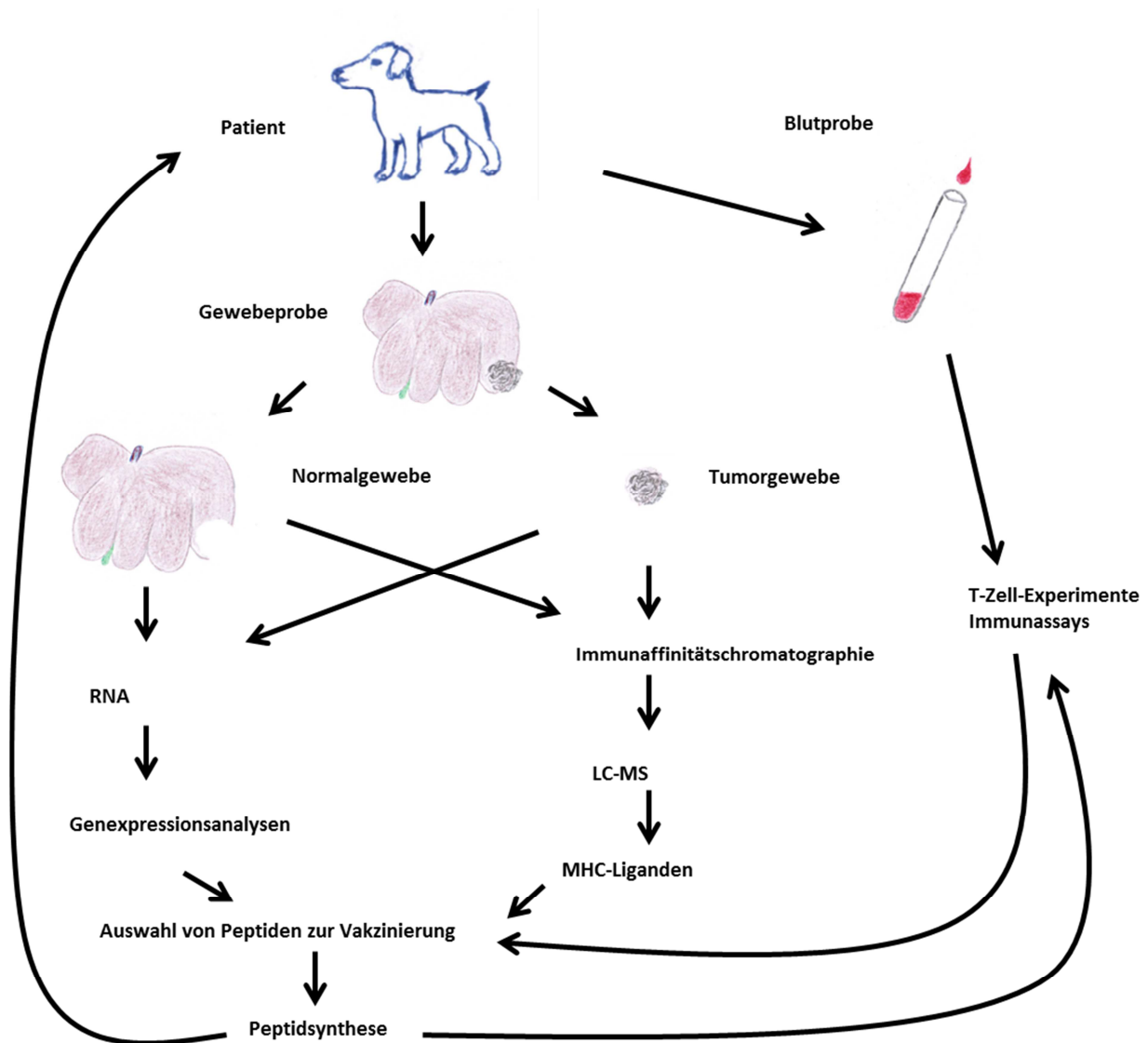
Vergleichbar mit dem Menschen besitzen Hunde ein relativ großes Risiko, mit steigendem Lebensalter Krebserkrankungen zu entwickeln. Da im wissenschaftlichen Bereich der Onkologie im humanen Sektor in der Zwischenzeit bereits ein weites Feld an Therapiemöglichkeiten zur Verfügung steht und eine Vielzahl der Tierbesitzer heutzutage bereit ist, in eine optimale, kostspielige Behandlung des tierischen Kameraden zu investieren, hat sich in den letzten Jahren auch das Spektrum an Therapiemöglichkeiten im veterinärmedizinischen Bereich stark erweitert. Somit kann bei Hunden in der heutigen Zeit neben der klassischen onkologischen Chirurgie auch auf eine zytostatische Therapie mit geeigneten Chemotherapeutika oder auf eine Strahlentherapie zurückgegriffen werden, um den Krebs zu besiegen oder zumindest zurückzudrängen. Jedoch ist die operative Entfernung von Tumorgewebe, je nach Lokalisation, nicht immer möglich oder bei bereits erfolgter Metastasenbildung nicht als alleinige Therapie ausreichend. Eine Strahlentherapie ist häufig auch mit der Schädigung von umliegendem gesundem Gewebe verbunden und eine Chemotherapie ist häufig mit einer Reihe von begleitenden Nebenwirkungen verknüpft. Aus diesem Grund ist der Wunsch nach einem Mittel zur Krebstherapie mit einer optimalen, nur auf den Krebs ausgerichteten Wirkung hoch. Eine Therapieform, die das Potential besitzt, in der Zukunft diesen Anspruch zu erfüllen, stellt die Immuntherapie von Krebserkrankungen dar – und hierbei insbesondere

die Stimulation des adaptiven Immunsystems mittels tumorspezifischer Vakzine. In der Vergangenheit konnten bereits einige Erfolge durch den Einsatz von Tumorzellvakzinen beim Hund erzielt werden. Jedoch ist einerseits, bei Verwendung dieser Methode, die Menge an zur Vakzinierung verfügbarem Material stets begrenzt und andererseits konnte nur selten eine komplette Tumorremission herbeigeführt werden [73, 74]. Eine Möglichkeit, um diese Schwierigkeiten zu beseitigen, könnte in Zukunft die Entwicklung von tumorspezifischen Peptidimpfstoffen für Hunde sein.

### 1.2.6 Tübingen Approach

Innerhalb des Körpers existiert in der Regel eine große Anzahl an zytotoxischen T-Zellen. Diese „patrouillieren“, wie bereits unter 1.1.2.1 beschrieben, durch die Blutbahn, das Lymphsystem und das Gewebe auf der Suche nach infizierten oder entarten Zellen, die sie mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors erkennen können. Hierzu bindet letztgenannter an MHC-Klasse-I-Moleküle verschiedener Körperzellen und untersucht das jeweilige, von ihnen präsentierte Peptidantigen aus dem Zellinneren. Hierbei kann es sich entweder um Antigene, die ihren Ursprung in unveränderten körpereigenen Quellproteinen haben, virusspezifische Antigene oder um Tumorantigene handeln. Im weiteren Verlauf werden Zellen, die Peptide präsentieren, die nicht aus dem natürlich exprimierten Proteinpool stammen, durch die zytotoxischen T-Zellen eliminiert, wohingegen Zellen mit den für gewöhnlich präsentierten Peptiden toleriert werden [75]. Jedoch liefern Tumorzellen in vivo häufig nicht ausreichend kostimulatorische Signale, die für das Priming von naiven T-Zellen und somit für eine Immunantwort des Körpers benötigt werden [76]. Wichtige Ansätze zur Überwindung dieses Problems lieferte der Forschungszweig der aktiven Tumorummuntherapie, zu dem auch der „Tübingen Approach“ der Arbeitsgruppe von Prof. Rammensee in Tübingen gezählt werden kann. Dieser stellt eine Methode dar, mit der sowohl tumorspezifische Antigene, die nur von Tumorzellen präsentiert werden, als auch tumorassoziierte Antigene (TAA), die bei Tumoren überexprimiert werden, aber auch in normalem Gewebe vorkommen [77], für die Krebstherapie identifiziert, selektiert und validiert werden können. Ziel ist es hierbei, durch subkutane oder intradermale Injektion, tumorspezifische Peptide und ausgewählte TAA den dort residierenden antigenpräsentierenden Zellen bereitzustellen, wodurch zytotoxische T-Zellen gegen eben diese Antigene geprimt werden können und anschließend in der Lage sind, eine spezifische Immunantwort gegen Krebszellen auszulösen. Anwendung finden hierbei Me-

thoden der Genomforschung, der Proteomik, der Bioinformatik sowie der T-Zell-Immunologie [15]. Im Rahmen des Tübingen Approaches erfolgt die Identifikation von natürlich präsentierten MHC-Klasse-I-Peptiden durch deren Elution von MHC-Komplexen primärer Tumorzellen und der nachfolgenden Analyse mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) gekoppelter Massenspektrometrie [78, 79]. Aus der Gesamtheit an identifizierten Peptiden kann dann in einem nächsten Schritt die Selektion von tumorspezifischen und tumorassoziierten Antigenen erfolgen. Zur Auswahl werden hierbei Daten aus komparativen Genexpressionsanalysen von Tumor- und zugehörigem Normalgewebe herangezogen, mit deren Hilfe beispielsweise starke TAA detektiert werden können, oder auch Daten aus personalisierten Genanalysen, die beispielsweise Aufschluss über das jeweilige MHC-Allel geben. Durch die Bestimmung des jeweiligen zugrunde liegenden MHC-Alleles kann weitergehend jeweils eine Bindungsaffinitätsvorhersage für jedes identifizierte Peptid getroffen werden und somit Peptide, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf den MHC-Molekülen binden können, ausgewählt werden. Im letzten Schritt wird die Fähigkeit der jeweils selektierten Peptide – nämlich T-Zellantworten auszulösen – mit Hilfe von verschiedenen, in vitro durchgeführten T-Zell-Experimenten (z. B. Interferon-gamma Elispot Test und Tetramer-Färbung) überprüft, da nicht alle natürlich prozessierten und präsentierten Peptide auch zwangsläufig eine gute Immunogenität aufweisen. Abschließend werden dann je Allel sechs bis zehn tumorspezifische oder -assoziierte Antigene ausgewählt und für die Immuntherapie weiterverwendet, wobei auch die Kombination von Peptiden verschiedener Allele bei heterozygoten Patienten möglich ist. Der Vorteil der Immuntherapie mittels Peptidvakzinen im Vergleich mit anderen Krebstherapien liegt in der relativ einfachen und kostengünstigen Herstellung sowie der leichten und sicheren Anwendbarkeit im klinischen Bereich [15].



**Abbildung 3: Der Tübingen Approach.**

Anwendung von Methoden der Genomforschung, der Proteomik, der Bioinformatik sowie der T-Zell Immunologie, um tumorspezifische und tumorassoziierte Antigene für eine T-Zell-Immuntherapie von Krebserkrankungen zu selektieren und zu identifizieren.

Quelle: in Anlehnung an [15].

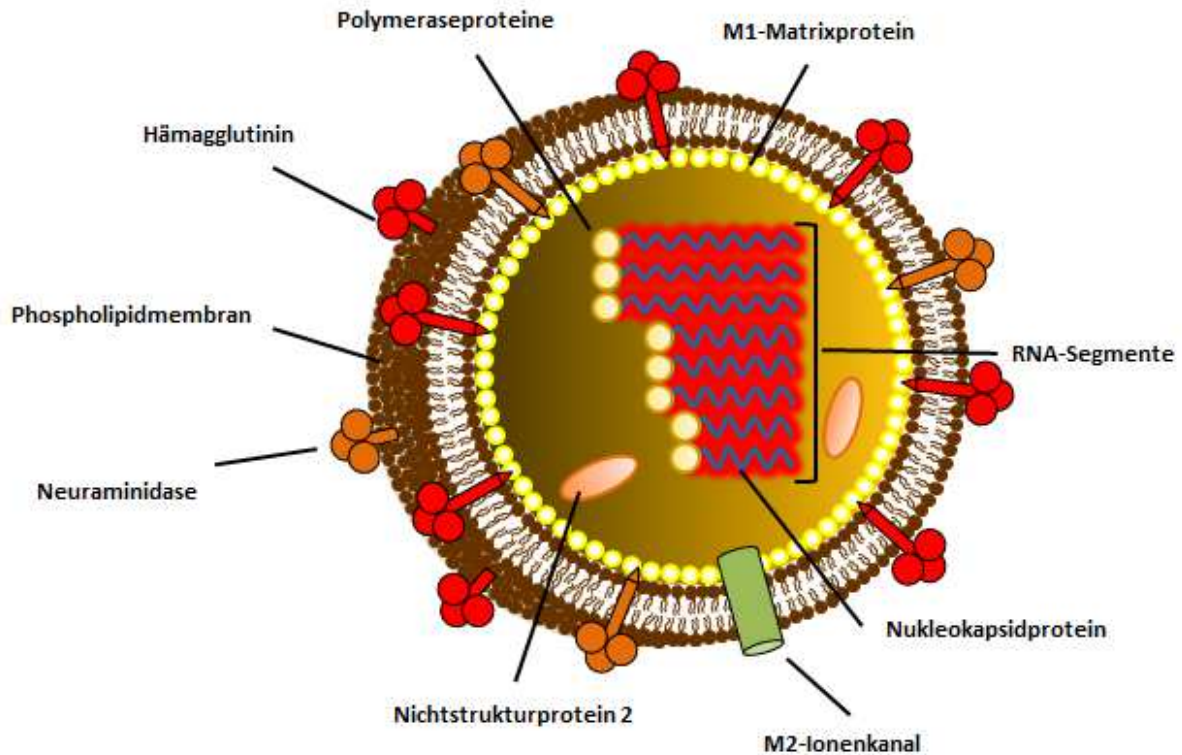
## 1.3 Das Influenzavirus

Influenzaviren stellen bedeutende humane Pathogene dar, die hauptsächlich die oberen Atemwege angreifen und vor allem eine Bedrohung für die Bevölkerungsgruppe der sogenannten YOPIs (Personengruppe aus Menschen mit den Eigenschaften „*young, old, pregnant, immunocompromised*“) darstellen. Hierzu werden Kinder unter 5 Jahre, ältere Menschen, Schwangere und Menschen mit geschwächtem Immunsystem gezählt. All diese haben im Verlauf einer Influenzavirusinfektion ein besonders hohes Risiko, schwerwiegende, lebensbedrohliche Komplikationen zu entwickeln. Weltweit können jährlich 3 bis 5 Millionen schwere Erkrankungen Influenzavirusinfektionen zugeordnet werden – und zwischen 250 000 und 500 000 Tote [80]. Influenzaviren werden meistens durch Tröpfcheninfektionen übertragen, Schmierinfektionen sind aber genauso möglich [81, 82]. Typische Symptome einer Influenzavirusinfektion sind unter anderem das plötzliche Auftreten von hohem Fieber, Husten, Schnupfen sowie eine starkes Erschöpfungs- und allgemeines Krankheitsgefühl. Als schwere Komplikation kann vor allem bei YOPIs eine primäre, virale oder eine sekundäre, bakterielle Lungenentzündung auftreten, mit daraus häufig resultierender Atemnot, Blaufärbung der Haut und Bluthusten, in deren Folge die Betroffenen häufig versterben [83]. Als wichtigste präventive Maßnahme gegen eine Reihe von Erkrankungen werden von der STIKO (Ständige Impfkommission am Robert Koch-Institut) Impfungen empfohlen. Im Falle des Influenzavirus bedeutet dies für einen Großteil der Gebiete der nördlichen Hemisphäre eine „jährliche Impfung im Herbst mit einem Impfstoff mit aktueller, von der WHO (World Health Organization) empfohlener Antigenkombination“ [84].

### 1.3.1 Einteilung und Aufbau

Influenzaviren werden zur Familie der Orthomyxoviren gezählt, gemeinsam mit den Isaviren, den Quaranjaviren sowie den Thogotoviren [85]. Gemäß der gängigen Klassifizierung lassen sich drei Typen von Influenzaviren unterscheiden: Influenzaviren Typ A, B und C (IAV, IBV, ICV). Das Genom der Influenzaviren besteht aus mehreren Segmenten, dabei weisen IAV und IBV jeweils ein Genom aus acht einzelsträngigen RNA-Abschnitten negativer Polarität auf, wohingegen ICV nur sieben beinhalten [86, 87]. Jedes RNA-Segment wird jeweils von Nukleokapsidproteinen umhüllt und besitzt zudem drei Polymeraseproteine [88] (Abbildung 3). Bei IAV kodieren die acht RNA-Abschnitte für zwölf bis dreizehn virale Proteine. Dazu gehö-

ren die Nichtstrukturproteine 1 und 2, das M1-Matrixprotein, das M2-Ionenkanalprotein, das Hämagglutinin, die Neuraminidase, das Nukleoprotein, der RNA-Polymerasekomplex (bestehend aus den Polymeraseproteinen 1 und 2 (PB1, PB2), zuzüglich dem sauren Polymeraseprotein (PA)) sowie die Proteine PB1-F2, PB1-N40 und PA-X [89, 90]. Die Nukleokapsidsegmente werden ihrerseits von einem Mantel aus M1-Proteinen umgeben, der wiederum von einer Phospholipidmembran bedeckt wird. Letztere beinhaltet die Oberflächenproteine Hämagglutinin und Neuraminidase sowie das Ionenkanalprotein M2. Anhand der Glykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase können IAV charakterisiert und in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Durch serologische Tests wie beispielsweise ELISA [91] (*enzyme-linked immunosorbent assay*) konnten bislang achtzehn verschiedene Hämagglutinin- und elf verschiedene Neuraminidaseproteine bestimmt werden [92]. Je nach Komposition dieser Proteine ergeben sich die verschiedenen IAV-Subtypen mit teilweise unterschiedlicher Wirtsspezifität, von denen in der Vergangenheit H1N1-, H2N2- und H3N2-Subtypen Pandemien in der humanen Bevölkerung ausgelöst haben [93]. In der Wissenschaft werden die verschiedenen Influenzavirusstämme auf folgende Weise bezeichnet: Als Erstes wird der Influenzotyp und der Ort der erstmaligen Isolierung (Virusanzucht) benannt, anschließend folgt die Nummer des Isolats sowie das Isolierungsjahr (Beispiel: Influenza B/Phuket/3073/2013). Ergänzend werden bei IAV zusätzlich die Subtypen der Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase angegeben (Beispiel: Influenza A/Regensburg/D6/2009 (H1N1)).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines Influenza-A-Virus.

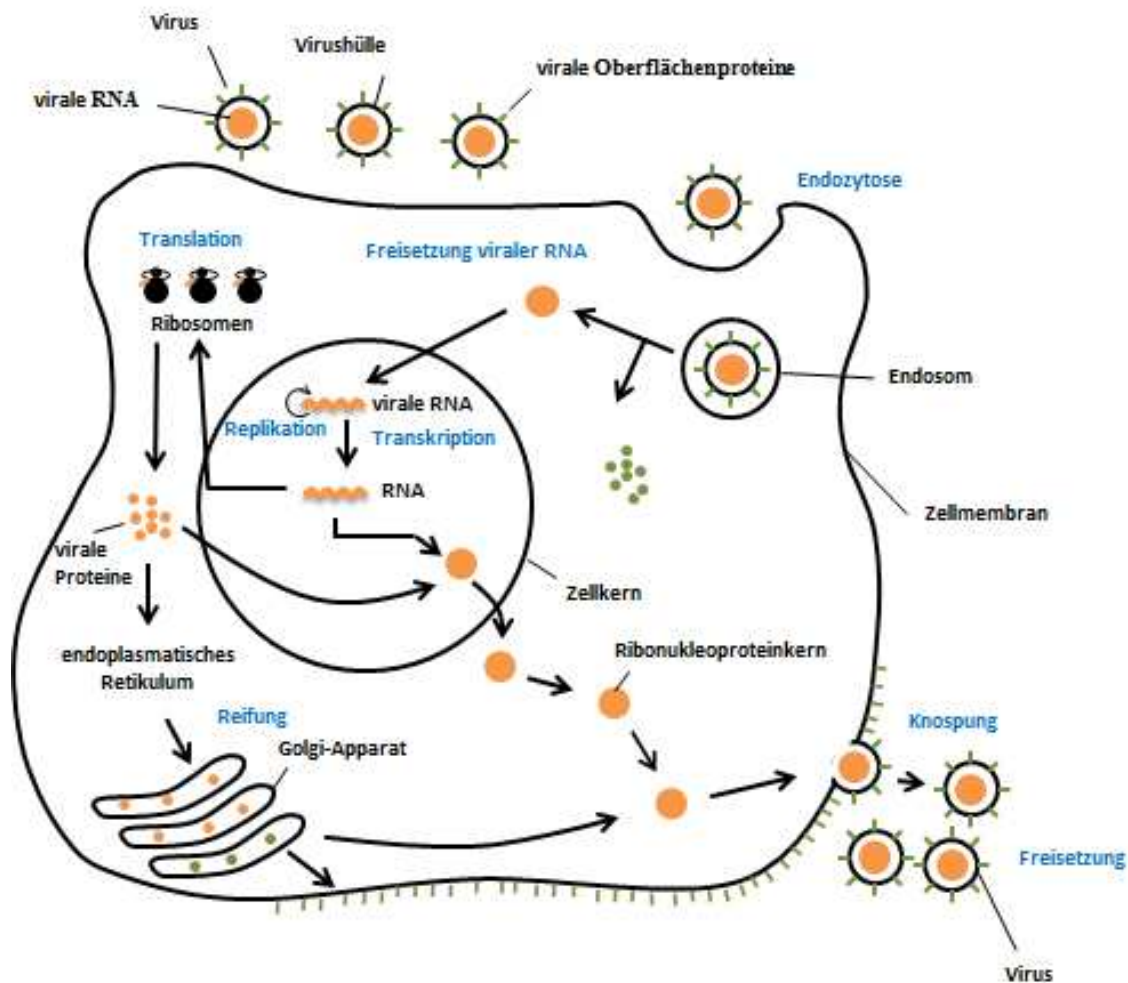
Dieses besteht aus acht viralen RNA-Segmenten, die jeweils mit drei Polymeraseproteinen und einem Nukleokapsidprotein assoziiert sind. Umhüllt werden das virale Genom sowie die Nichtstrukturproteine 2 von einer Phospholipidmembran und einer Schicht aus Matrixproteinen. In die Phospholipidmembran sind jeweils die Oberflächenproteine Hämagglutinin, Neuraminidase und das Ionenkanalprotein eingelagert. Quelle: in Anlehnung an [88].

### 1.3.2 Influenzavirusinfektion

Die Infektion von Wirtszellen verläuft in einem mehrschrittigen Prozess, der in Abbildung 4 dargestellt wird. Eine wichtige Rolle kommt hierbei dem viralen Oberflächenprotein Hämagglutinin zu, welches aus drei gleichen Einheiten besteht, die jeweils als HA0 bezeichnet werden. Damit eine Wirtszelle infiziert werden, kann müssen zwei wichtige Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen muss das HA0 durch Proteasen in die Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten worden sein, da nur durch diesen Vorgang das Fusionspeptid am N-Terminus des HA2 freigegeben und somit eine spätere Freisetzung der viralen RNA in die Wirtszelle ermöglicht wird [94, 95]. Zum anderen muss das Viruspartikel mit seinem Hämagglutinin an Sialinsäure-haltige Zuckerreste auf der Wirtszelloberfläche gebunden haben, da dies erst die Auf-



nahme in die Zelle mittels Endozytose ermöglicht. Hat ein Virion diese ersten zwei Hürden überwunden, erfährt es im Anschluss eine Absenkung des pH-Wertes innerhalb des Endosoms. Diese Zunahme der Azidität bewirkt daraufhin die Aktivierung der M2-Ionenkanalproteine in der viralen Hüllmembran, woraufhin Protonen in das Innere des Viruspartikels transferiert werden und somit die Matrixproteine von den Nukleokapsidsegmenten gelöst werden [96]. Des Weiteren bewirkt die pH-Wert-Veränderung innerhalb des Endosoms eine Konformationsänderung am viralen Hämagglutinin, wodurch das hydrophobe Fusionspeptid in die Membran des Endosoms eingefügt wird. Durch diese Eingliederung kann in der Folge die virale an die endosomale Membran herangezogen werden, so dass beide schließlich fusionieren und die Ribonukleoproteinkomplexe in das Zytosol der Wirtszelle gelangen [95, 97]. Im Anschluss werden die Ribonukleoproteinkomplexe mittels ihrer Kernlokalisierungssequenzen in den Zellkern importiert [98]. Dort erfolgt die Transkription der viralen RNA in Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA), wobei der virale Polymerasekomplex, der aus den Proteinen PB1, PB2 und PA besteht, Verwendung findet. Da Influenzaviren die Transkription ihrer RNA nicht selber einleiten können, bedienen sie sich eines Vorgangs, der als sogenanntes Kappen-Stehlen (*cap snatching*) bezeichnet wird. Hierbei wird zunächst mit Hilfe des PB2-Proteins das 5'-kappentragende Ende eines Wirtszell-mRNA-Moleküls an das 3'-Ende eines viralen RNA-Segments angelagert und anschließend wird die zelluläre mRNA etwas unterhalb ihrer Kappenstruktur durch das PA-Protein geschnitten. Die neu hergestellten mRNA-Moleküle verlassen anschließend den Zellkern ins Zytoplasma. Dort erfolgt die Neubildung der viralen Oberflächenproteine Hämagglutinin, Neuraminidase und des M2-Ionenkanalproteins durch Translation der viralen mRNA an Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums, von wo aus die neu gebildeten Proteine mittels des Golgi-Apparates an die Wirtszellmembran transportiert werden.



**Abbildung 5: Replikationszyklus des Influenza-A-Virus.**

Das Influenza-A-Virus bindet zunächst an das Oberflächenprotein Hämagglutinin der Wirtszelle und gelangt im Anschluss durch rezeptorvermittelte Endozytose in das Zellinnere. Dort wird die virale RNA freigesetzt, in den Zellkern transportiert und zur Replikation und Transkription verwendet. Die neu entstandene mRNA wird im Zytoplasma in virale Proteine translatiert. Die neu gebildeten Virusteile werden an die Zellmembran transportiert und zusammengebaut. Anschließend kommt es zur Knospung der viralen Partikel und Freisetzung in den extrazellulären Raum.

Quelle: in Anlehnung an [99].

Das auf diese Weise entstandene zelluläre Oligomer wird in der Folge von dem viralen PB1-Protein als Primer zur Transkription der viralen RNA in mRNA genutzt. Neben der Bereitstellung eines Startpunktes für die virale RNA-Transkription ermöglicht das Kappen-Stehlen dem

Virus zusätzlich, die Protein-Biosynthese-Maschinerie der Wirtszelle für sich zu beanspruchen und somit auch die Produktion zellspezifischer Proteine zurückzufahren [98, 100].

Die übrigen viralen Proteine werden, im Gegensatz zu den membranassoziierten Proteinen, an Ribosomen innerhalb des Zytoplasmas synthetisiert und anschließend in den Zellkern transportiert [88]. Im Rahmen der Transkription werden dort, neben kappentragenden mRNA-Molekülen, auch kappenlose, komplementäre RNA-Moleküle (cRNA) mit Hilfe des viralen Polymerasekomplexes generiert. Diese cRNA-Moleküle dienen im Anschluss der Replikation viraler RNA, da sie Zwischenprodukte darstellen, aus denen in einem weiteren Transkriptionsschritt neue RNA-Moleküle negativer Polarität hergestellt werden [101]. Betrachtet man den Zeitpunkt, an dem es zu einer Akkumulation neu gebildeter viraler RNA-Moleküle kommt, fällt auf, dass dieses Ereignis erst eintritt, nachdem neu synthetisierte virale Proteine im Zellkern eingetroffen sind. Für diese Beobachtung existieren im Moment mehrere Erklärungsversuche, die kontrovers diskutiert werden. Eine Theorie besagt beispielsweise, dass die neu gebildeten Proteine, insbesondere die Nukleoproteine, einen Wechsel der viralen Polymerasefunktion von Transkription auf Replikation anregen und diese somit erst die Transkription der viralen cRNA initiieren. Einer anderen Theorie zufolge, die in jüngster Zeit vermehrt Beachtung findet, wird hingegen angenommen, dass durch die Aktivität der viralen Proteine keine Änderung in der Funktion des Polymerasekomplexes bewirkt wird. Sondern es wird vielmehr davon ausgegangen, dass erst neu synthetisierte Polymerase- und Nukleoproteine die neu gebildeten cRNA-Moleküle stabilisieren und infolgedessen vor dem Abbau schützen, wodurch eine vollständige virale RNA-Replikation ermöglicht wird [102, 103].

Nach der Replikation erfolgt die Assoziation der neu generierten RNA-Moleküle mit Nukleoproteinen sowie Polymerasekomplexen zu Nukleokapsiden, an die zusätzlich M1-Proteine gebunden werden. Im Anschluss werden die Ribonukleoproteine durch NS2-Proteine, die an die M1-Proteine binden, aus dem Zellkern exportiert und zu den Stellen an der Wirtszellmembran mit einem erhöhten Vorkommen an neu gebildeten Oberflächenproteinen transportiert [104]. Dort binden die M1-Proteine vermutlich an Strukturen der in der Wirtszellmembran eingelagerten Hämagglutinin- und Neuraminidasemoleküle [105] und die Wirtszellmembran beginnt die neu entstandenen Nukleokapside zu umhüllen. Schließlich kommt es zur Ausknospung der viralen Partikel sowie zu einer Abspaltung von Sialinsäuren von Glykoproteinen und Glykolipiden auf der Virus- und Wirtszelloberfläche durch virale Neurami-

nidase-Moleküle. Durch letzteren Schritt werden die Viruspartikel freigesetzt, wodurch in der Folge weitere Wirtszellen infiziert werden können [106].

### 1.3.3 Infektionsfähigkeit von Zellen/Geweben

Wie vorangehend bereits beschrieben, wird die Influenzavirusinfektion auf molekularer Ebene durch das virale Oberflächenprotein Hämagglutinin (HA), das an SA-haltige Rezeptoren (SA: Sialinsäure) von Schleimhautepithelzellen bindet, in die Wege geleitet. Welche Wirtszellen infiziert werden können und welche nicht, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Als erstes sei genannt, dass Influenzaviren je nach HA-Subtyp unterschiedliche Präferenzen bezüglich der von ihnen gewählten Sialinsäurezuckerketten besitzen. So binden zum Beispiel HA-Subtypen, die an den Menschen angepasst sind, vermehrt an  $\alpha 2,6$ -gebundene Sialinsäuren, während an den Vogel adaptierte Subtypen  $\alpha 2,3$ -gebundene bevorzugen [107]. Neben dieser unterschiedlichen Affinität des Hämagglutinins entscheidet vermutlich auch die Lokalisation bestimmter SA-haltiger Rezeptoren innerhalb der jeweiligen Wirtsspezies über den Grad der Infektionsfähigkeit und die Schwere des Krankheitsverlaufes. Diese Annahme hat ihren Ursprung in Forschungsergebnissen, wonach beim Menschen  $\alpha 2,6$ -Zuckerstrukturen hauptsächlich auf Epithelzellen des oberen Respirationstrakt zu finden sind – im Gegensatz zu  $\alpha 2,3$ -Zuckerstrukturen, die beim Menschen vermehrt im unteren Respirationstrakt und beim Vogel hauptsächlich im Darm vorkommen [108]. Gestützt wird diese Annahme auch durch damit korrelierenden Beobachtungen, denen zufolge humanspezifische Influenzaviren beim Menschen in der Regel relativ leicht innerartlich übertragen werden, wohingegen bei aviären Influenzaviren eher relativ selten eine humane Infektion und Übertragung von Mensch zu Mensch stattfindet [107]. Als weiterer Faktor, der in der Lage ist, die Spezifität der verschiedenen Influenzasubtypen zu beeinflussen, kann der Aufbau der Spaltstelle innerhalb des Hämagglutinins betrachtet werden. Je nachdem, wie dessen Aminosäureabfolge gestaltet ist, können unterschiedliche Enzyme in schneidender Funktion tätig werden. Niedrigpathogene Influenzaviren besitzen beispielsweise eine monobasische Spaltstelle im Hämagglutinin, die nur von Trypsin-ähnlichen Proteasen gespalten werden kann, deren Vorkommen auf bestimmte Gewebe innerhalb des Respirations- oder Verdauungstraktes begrenzt ist. Im Gegensatz hierzu verfügt das Hämagglutinin hochpathogener Influenzaviren über eine polybasische Spaltstelle, die durch Furin-ähnliche Proteasen, die fast überall im Wirtskörper vorkommen, geschnitten werden kann. Somit lässt sich mit Hilfe dieser Unter-

schiede im Hämagglutinin relativ gut erklären, weshalb niedrigpathogene Influenzaviren in der Regel lokal begrenzt im Körper in Erscheinung treten, während hochpathogene Influenzaviren meistens schwere systemische Infektionen bewirken [109-112].

### **1.3.4 Evolution der Influenzaviren**

Vergleicht man das Wirtsspektrum von IAV mit dem von IBV und ICV, zeichnen sich erstgenannte durch eine auffallend hohe Variabilität aus. IAV-Infektionen wurden in der Vergangenheit bei einer relativ großen Anzahl verschiedener Spezies beobachtet wie z. B. bei Mensch, Vogel, Schwein, Pferd und Hund [113], IBV-Infektionen hingegen sind bislang nur bei Mensch und Seehund [114] sowie ICV-Infektionen nur bei Mensch und Schwein bekannt [115]. Die auffallend hohe Variabilität im Wirtsspektrum der IAV, die Periodizität von Influenzaepidemien sowie das Auftreten immer neuer Influenzavirusstämme lässt sich durch zwei besondere Mechanismen erklären, die als Antigen shift und Antigen drift bezeichnet werden [101, 116].

#### **1.3.4.1 Antigen drift**

Unter Antigen drift versteht man die allmähliche Veränderung von viralen Oberflächenantigenen infolge von Punktmutationen der RNA. IAV und IBV besitzen eine relativ hohe Mutationsrate von ungefähr  $10^{-6}$  bis  $10^{-5}$  Substitutionen/Nukleotidposition/Replikationszyklus [117, 118]. Dies ist durch die hohe Fehlerrate der viralen RNA-Polymerase während der Replikation sowie durch die fehlende Korrekturlesefunktion zu erklären [119]. Dadurch sind die Influenzaviren immer wieder in der Lage, ihre Oberflächenantigene zu verändern. Hierbei kommt insbesondere dem Hämagglutinin eine besondere Bedeutung zu, da dieses hauptsächlich durch die Antikörper des adaptiven Immunsystems erkannt werden kann [120]. Zwar werden im Anschluss an eine Infektion oder Impfung im Körper Antikörper produziert, die einen langfristigen Schutz gegen Influenzaviren bilden, diese sind jedoch nur gegen das Hämagglutinin von Viren des gleichen Subtyps gerichtet. Neu entstandene Subtypen mit unbekanntem Hämagglutinin bleiben hierbei jedoch von den Antikörpern unerkannt und verschont [121]. Somit kann das Influenzavirus immer wieder das humorale Immunsystem umgehen und beim Menschen zu jährlich wiederkehrenden Influenzaepidemien mit immer neuen Virusvarianten führen. Des Weiteren besitzen Influenzaviren mittels Antigen drift die Möglichkeit, ihre Wirtsspezifität zu verändern. Untersuchungen haben gezeigt, dass bereits

die Veränderung einer einzelnen Aminosäure im Hämagglutinin die Spezifität für bestimmte Sialinsäurerezeptoren auf der Wirtszelloberfläche verändern kann. Bei der Spanischen Grippe von 1918 zum Beispiel erfuhr vermutlich ein an den Vogel adaptierter Influenza-Subtyp durch Punktmutationen eine zusätzliche Anpassung an den Menschen. Hierbei erfolgte wahrscheinlich der Austausch von Glutaminsäure an Position 190 und Glycin an Position 225 im Hämagglutinin durch Asparaginsäure, wodurch eine größere Bindungsaffinität für humane  $\alpha$ -2,6-SA-Rezeptoren entstand [122].

#### 1.3.4.2 Antigen shift

Influenza-A-Viren zeichnen sich durch das Auftreten immer neuer Subtypen aus. Dabei lässt sich deren Entstehung unter anderem auf den Austausch von Gensegmenten zwischen bekannten Influenzavirus-Subtypen zurückführen. Dieser Vorgang wird auch als genetische Reassortierung (Neu-Gruppierung) bezeichnet. Voraussetzung hierfür ist die Ko-Infektion einer Zelle mit zwei unterschiedlichen Virussubtypen. Infolgedessen wird das Genom beider Viren gleichzeitig repliziert, wobei es zu einer Neukombination der Gensegmente kommen kann [123]. Betrifft diese Neuzusammenstellung Gensegmente, die für die viralen Oberflächenantigene Hämagglutinin und Neuraminidase kodieren, und stammen diese zusätzlich von Viren mit unterschiedlicher Wirtsadaptation, so können neue Virussubtypen mit veränderter Wirtsspezifität entstehen. Diese plötzlich auftretende Änderung in der Antigenität eines Influenzavirus wird als Antigen shift bezeichnet. Es wird angenommen, dass Schweine bei der genetischen Reassortierung einen besonderen Stellenwert einnehmen, da diese sowohl  $\alpha$ -2,3- als auch  $\alpha$ -2,6-SA-Rezeptoren besitzen und daher durch humane sowie auch durch aviäre Influenzaviren gleichzeitig infiziert werden können. Aus diesem Grund werden Schweine auch als potentielle Mischgefäße (*mixing vessels*) betrachtet, die für die Entstehung neuer Virustypen verantwortlich sein können. Eine besondere Gefahr für die Menschheit stellt hierbei die Erweiterung der Wirtsspezifität hochpathogener aviärer Influenzaviren vom Vogel auf den Menschen innerhalb des Schweins dar [124].

## 2 Zielsetzung

In der heutigen Zeit existiert eine Vielzahl von Behandlungsmethoden, die zur Krebstherapie eingesetzt werden. Hierzu gehört unter anderem die Immuntherapie von Krebserkrankungen mittels tumorspezifischer Peptidvakzine. Hierbei werden ausgewählte Tumorantigene verwendet, um eine spezifische T-Zell-Antwort gegen Krebszellen auszulösen. Um eine Tumor-Vakzinierung beim Hund etablieren zu können, muss zunächst in Erfahrung gebracht werden, wie Peptide auf den MHC-Klasse-I-Molekülen beim Hund befestigt sind. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, das Bindemotiv für das canine Allel DLA-88\*03201 zu definieren, wodurch in Zukunft leichter eine Zuordnung von DLA-assoziierten Peptiden vorgenommen werden kann. Da in der Vergangenheit von einer starken Ähnlichkeit zwischen den bereits charakterisierten Bindemotiven von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 berichtet wurde, sollte in dieser Arbeit als weiteres Ziel der Vergleich von viralen und zellulären DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Liganden vorgenommen werden. Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, die Immunantwort caniner Zellen sowie die T-Zell-Reaktion beim Hund im Rahmen verschiedener Infektionskrankheiten besser verstehen zu können, woraus sich in Zukunft ein Nutzen für den Hund, möglicherweise sogar auch für den Menschen ergeben mag.





## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Antikörper

Tabelle 1: verwendete Antikörper

Antikörperbezeichnung	Hersteller
Anti-Influenza A Nucleoprotein monoclonal antibody (MCA-400)	BIO-RAD, Hercules, USA
Anti-Mouse CD 16/32	eBioscience, San Diego, USA
Anti-HLA-A3 antibody	in Eigenproduktion hergestellt durch C. Falkenburger
BBM.1 anti-Human- $\beta_2$ -microglobulin monoclonal antibody; immunoglobulin IgG2b	in Eigenproduktion hergestellt durch C. Falkenburger
Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
humanes IgG (100 g/L)	in Eigenproduktion hergestellt durch C. Falkenburger
Peroxidase AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
W6/32 anti-Human HLA-ABC monoclonal antibody; immunoglobulin IgG2a	in Eigenproduktion hergestellt durch C. Falkenburger

#### 3.1.2 Enzyme

Tabelle 2: verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
PvuI Restriktionsenzym	NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Frankfurt, DEU

### 3.1.3 Chemikalien

**Tabelle 3: verwendete Chemikalien**

Bezeichnung	Hersteller
100 x BSA	NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Frankfurt, DEU
2-Propanol (Isopropanol)	MerckMillipore, Billerica, USA
Ammoniumacetat 7,5 M	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Avicel	FMC Health and Nutrition
Bovine Albumin Fraction V (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Buffer EB Elutions-Puffer	QIAGEN, Hilden, DEU
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid) in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CHAPS BC	AppliChem, Darmstadt, DEU
Chloroform	Roth, Karlsruhe, DEU
CNBr-aktivierte Sepharose	GE Healthcare, Freiburg, DEU
Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dilution Buffer	GENAXXON bioscience, Ulm, DEU
DMSO	Merck Millipore, Billerica, USA
DPBS – Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol (99 %)	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DEU
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
FACS Lysing solution	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
FACS-Clean solution	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
FACS-Flow solution	In Eigenproduktion hergestellt
FACS-Rinse solution	BD Biosciences, Heidelberg, DEU

Bezeichnung	Hersteller
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fixation/Permeabilization Concentrate solution	eBioscience, San Diego, USA
Fixation/Permeabilization Diluent solution	eBioscience, San Diego, USA
Flächendesinfektionsmittel Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld, DEU
IMDM-Medium	Lonza, Basel, CHE
Isoamylalkohol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LC-MS Acetonitril	J.T.Baker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
LC-MS Wasser	J.T. Baker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Lipofectamine3000-Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid) in H <sub>2</sub> O	Merck Millipore, Billerica, USA
Minimum Essential Medium (MEM) (10x)	Gibco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Natriumacetat-Lösung (3M; pH 5,2)	AppliChem, Darmstadt, DEU
NEB3.1-Puffer	NEW ENGLAND BioLabs GmbH, Frankfurt, DEU
Ethanol p. a.	Merck Millipore, Billerica, USA
P3000 TM Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin (100 mM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Permeabilization Buffer	eBioscience, San Diego, USA
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Roti-Histofix 10 %	Carl Roth, Karlsruhe, DEU

Bezeichnung	Hersteller
RPMI-Medium 1640	Gibco (Life technologies, Darmstadt, DEU)
Salzsäure (HCl) (0.1 M)	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
ScreenFectA	GENAXXON bioscience, Ulm, DEU
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck Millipore, Billerica, USA
Triton X-100 solution	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
TrueBlue Peroxidase Substrate	KPL (SeraCare), Gaithersburg, USA
Trypanblau	MerckMillipore, Billerica, USA
Trypsin (Pulverform)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Tween 20	Merck Millipore, Billerica, USA

### 3.1.4 Geräte

Tabelle 4: verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage MC BA 100	Sartorius, Göttingen, DEU
Analysenwaage XS105 DR	Mettler Toledo GmbH, Columbus, USA
Autosampler-Vial	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
BD FACS-Jazz Zellsorter	BD Biosciences, Heidelberg, DEU
Canoscan 8800F Scanner	Canon, Tokio, JP
Capacitance Extender Plus	BIO-RAD, Hercules, USA
Durchflussszytometer FACSCalibur	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

Bezeichnung	Hersteller
Flockeneis-Bereiter AF 30	Scotsman, Illinois, USA
Gene Pulser II	BIO-RAD, Hercules, USA
GFL 1083 Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel, DEU
Hamilton-Spritze 50 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heracell 150 i Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
Heraeus Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Ha- nau, DEU
Heraeus Multifuge 1S-R	Heraeus Instruments GmbH, Ha- nau, DEU
Heraeus Varifuge 3. OR	Heraeus Instruments GmbH, Ha- nau, DEU
Inverses Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, DEU
Kreisschüttler KS125	IKA, Staufen, DEU
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, CHE
Lichtmikroskop	A.Krüß Optronic, Hamburg, DEU
Mass spectrometer LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
Mass spectrometer Orbitrap Fusion Lumos	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA
Micro Shaker Schütteltisch	Dynatech, DEU
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Nalgene (Thermo Fisher Scien- tific, Waltham, USA)
NanoDrop1000 Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen, DEU
Nano-HPLC-Säule	Thermo Fisher Scientific, Wal- tham, USA

Bezeichnung	Hersteller
Neubauer-improved-Zählkammer (0,1 mm Tiefe)	Marienfeld superior, Lauda-Königshofen, DEU
Peristaltische Pumpe P-1	Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences, Konstanz, DEU
Pipette Discovery Comfort Single Channel 0,1–2 µl	HTL LAB SOLUTIONS, Warszawa, POL
Pipette Discovery Comfort Single Channel 200–1000 µl	HTL LAB SOLUTIONS, Warszawa, POL
Pipette Discovery Comfort Single Channel 20–200 µl	HTL LAB SOLUTIONS, Warszawa, POL
Pipette Discovery Comfort Single Channel 2–20 µl	HTL LAB SOLUTIONS, Warszawa, POL
Pipette Multikanal	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Pipette Multikanal Discovery Pro 20-200 µl	HTL LAB SOLUTIONS, Warszawa, POL
Potter (RB 18 Vario Tischbohrmaschine)	Rotwerk GmbH, München, DEU
Rotor TFT-45.49	Kontron Instruments, Zürich, CHE
Sorvall RC-5C Plus Centrifuge	Sorvall (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Sterilbank Tecnoflow 3F150-II GS	Integra Biosciences, Konstanz, DEU)
UltiMate 3000 RSLC-nano System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifuge Optima L-80	Beckman Coulter, Brea, USA
Vakuumzentrifuge SpeedVac Concentrator	Bachofen
Vortexer	IKA, Staufen, DEU
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, DEU

### 3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
24-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
6-Well-Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
96-Well-Platte (F-Boden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
96-Well-Platte (U-Boden)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Amicon Ultra-0,5 ml Zentrifugationseinheit 3kD	Merck Millipore, Billerica, USA
Dreiwegehahn	BIO-RAD, Hercules, USA
Einmalpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
FACS Röhrchen (5 ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Laborhandschuhe	Abena, Zörbig, DEU
Pipettenspitzen (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Pipettenspitzen für MS (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Axygen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Pipettenspitzen Zip Tip mit C18-Matrix 2 µl	Merck Millipore, Billerica, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Reaktionsgefäße niedrig-bindend (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DEU
Reservoirs 50 ml, 100 ml	Corning Incorporated, Corning, USA

Bezeichnung	Hersteller
Sorvallflaschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spritzen (steril) 50 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Sterilfilter (0,22; 0,5 µm)	Merck Millipore, Billerica, USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU

### 3.1.6 Puffer, Medien, Lösungen

Tabelle 6: verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Acetonitril-Lösung (80 %) MS rein	LC-MS Acetonitril	400 ml
	LC-MS Wasser	100 ml
Avicel Stammlösung	zweifach destilliertes Wasser	100 ml
	Avicel	2,5 g
Avicel-Mix	Avicel-Stammlösung	5 ml
	Infektionsmedium	5 ml
	Versene-Trypsin	12 µl
BA-IMDM-Inkubationsmedium	IMDM	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	BSA/PBS-Stammlösung	3 ml
BA-RPMI-Inkubationsmedium	RPMI	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	BSA/PBS-Stammlösung	3 ml
BSA/PBS-Stammlösung	PBS	
	BSA	35 %
CHAPS-Lysepuffer	Protease-Inhibitor-Tablette	1



Bezeichnung	Zusammensetzung	
Einfriermedium	CHAPS BC	0,4 g
	DPBS	33 ml
	IMDM/RPMI-Zellkulturmedium	4 ml
	DMSO	0,5 ml
	FBS	0,5 ml
FACS-Puffer	BSA	2,5 g
	EDTA (pH-8, 0,5 M)	1,6 ml
	DPBS	500 ml
FBS-Lösung (10 %)	FBS	50 ml
	PBS	450 ml
Fixations-/Permeabilisationsreagenz	Fixation/Permeabilisation	3,75 ml
	Diluent Solution	
	Fixation/Permeabilisation	1,25 ml
	Concentrate Solution	
G418-Stammlösung	G418-Sulfat	3,425 g
	RPMI	50 ml
humanes IgG (FcR-Blockierungslösung)	humanes IgG	0,005 ml
	FACS-Puffer	10 ml
IMDM-Medium für Zellkultur	IMDM-Medium	500 ml
	Penicillin-Streptomycin	5 ml
	FBS	50 ml
IMDM-Selektivmedium	IMDM-Medium für Zellkultur	49 ml
	G418-Stammlösung	1 ml
Infektionsmedium	zweifach destilliertes Wasser	346 ml
	MEM (10 x)	100 ml
	Penicillin/Streptomycin	10 ml
	DEAE-Dextran	
	Natriumhydrogencarbonat	28 ml

Bezeichnung	Zusammensetzung	
	(7,5 %)	
	DEAE-Dextran-Lösung (1 %)	10 ml
	BSA-Lösung (35 %)	6 ml
Infektions-PBS	DPBS	500 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
	CaCl <sub>2</sub> /MgCl <sub>2</sub> Lösung	1 ml
	BSA/PBS-Stammlösung	3 ml
Lösung mit FACS Lysing Solution	zweifach destilliertes Wasser	4,5 ml
	FACS Lysing Solution	0,5 ml
Lösung Roti-Histofix (4 %) Fixationslösung	DPBS	100 ml
	Roti-Histofix 10 %	400 ml
	zweifach destilliertes Wasser	500 ml
Lösung Triton X-100 (0,3 %)	DPBS	500 ml
	Triton X-100	1,5 ml
Lösung Tween 20 (0,1 %)	Tween 20	0,5 ml
	DPBS	500 ml
Lösung Tween 20 mit FBS (10 %)	Tween 20 (0,1 %)	9 ml
	FBS	1 ml
Lösungsmittel A*	LC-MS Wasser	
	Trifluoressigsäure	0,1 %
Lösungsmittel Abe	LC-MS Wasser	
	LC-MS Acetonitril	32 %
	Trifluoressigsäure	0,2 %
Lösungsmittel A <sub>LOAD</sub>	LC-MS Wasser	
	LC-MS Acetonitril	1 %
	Trifluoressigsäure	0,05 %
Lösungsmittel B*	LC-MS Wasser	
	LC-MS Acetonitril	80 %

Bezeichnung	Zusammensetzung	
MgCl <sub>2</sub> /CaCl <sub>2</sub> Lösung	Trifluoressigsäure	0,1 %
	Ca <sup>+</sup> 0,9 mM; Mg <sup>2+</sup> 0,5 mM	0,2 %
	PBS	100 ml
Ethanol 70 % p. a.	Ethanol p. a.	70 ml
	LC-MS Wasser	30 ml
Peptidlösung	DMSO	1 ml
	FITC-markiertes Peptid	1 mg
Perm/Wash-Lösung	zweifach destilliertes Wasser	90 ml
	Permeabilization Buffer	10 ml
Phenol/Chloroform-Lösung	Phenol	500 µl
	Chloroform	500 µl
Roti-Histofix (4 %)	Roti-Histofix (10 %)	400 ml
	PBS	100 ml
	zweifach destilliertes Wasser	500 ml
RPMI-Medium für Zellkultur	RPMI Medium 1640	500 ml
	Penicillin-Streptomycin	5 ml
	FBS	50 ml
RPMI-Medium mit DMSO	RPMI-Medium für Zellkultur	990 µl
	DMSO	10 µl
RPMI-Selektivmedium	RPMI-Medium für Zellkultur	49 ml
	G418-Stammlösung	1 ml
0,2 % TFA-Lösung	LC-MS Wasser	98,8 ml
	Trifluoressigsäure	0,2 ml
10 % TFA-Lösung	LC-MS Wasser	50 ml
	Trifluoressigsäure	5 ml
Trypanblau-Lösung	PBS	100 ml
	Trypanblau	0,2 g

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Trypsin in PBS (1 ×)	DPBS	
	Trypsin (10 ×)	10 %
Versene-Trypsin	PBS	2 l
	Difco Trypsin 1 : 250	2,5 g
	EDTA	2,5 g

### 3.1.7 Zelllinien

Tabelle 7: verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
A549	adhärent wachsende humane Lungenkarzinomzellen [125, 126]
C1R	B-lymphoblastoides Epstein-Barr-Virus, immortalisierte humane Suspensionszelllinie [127]
C1R-DLA-88*03201	C1R-Zellen, die das canine MHC-Klasse-I-Allel DLA-88*03201 tragen
C1R-DLA-88*50101	C1R-Zellen, die das canine MHC-Klasse-I-Allel DLA-88*50101 tragen [128]
C1R-HLA-A*02:01	C1R-Zellen, die das humane MHC-Klasse-I-Allel HLA-A*02:01 tragen [129]
JY	B-lymphoblastoides Epstein-Barr-Virus, immortalisierte humane Suspensionszelllinie [130]
K 562	humane Leukämiezellen (Erythrozytenvorläuferzellen) [131]
K562-DLA-88*03201	K562-Zellen, die das canine MHC-Klasse-I-Allel DLA-88*03201 tragen
MDCKII ( <i>Madin-Darby canine kidney cells</i> )	adhärent wachsende canine Nierenepithelzellen [132]

### 3.1.8 Software

**Tabelle 8: verwendete Software**

Bezeichnung	Hersteller
CellQuestPro	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FloJo 10.0.7	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DEU
GibbsCluster-2.0 Server	Department of Bioinformatics; TU Dänemark, DNK
Ligandosphere	Immunologie Universität Tübingen, DEU
Mascot Server 2.2.04	Matrix Science, Boston, USA
Microsoft Office 2010 (Word/Excel)	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Motiffinder	Immunologie Universität Tübingen, DEU
NCBI-Nukleotiddatenbank	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
netMHC-3.4	Department of Bioinformatics, TU Dänemark, DNK
NetMHCpan 3.0	Department of Bioinformatics, TU Dänemark, DNK
Paint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SEQUEST-Suchalgorithmus	Thermo Finnigan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
SYFPEITHI	Immunologie Universität Tübingen, DEU
SYFPEITHI@home	Immunologie Universität Tübingen, DEU
Thermo Proteome Discoverer 1.4	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
WebLogo	Berkely, University of California, USA

### 3.1.9 Virus

Influenza A/Regensburg/D6/2009 (H1N1)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.2.1.1 Zellkultur

Um eine Kontamination der jeweiligen Zelllinie durch Pathogene zu vermeiden, wurde strikt darauf geachtet, alle Arbeiten unter der Sterilbank durchzuführen. Um sterile Bedingungen zu gewährleisten, wurden darüber hinaus nur Gefäße verwendet, die entweder steril verpackt oder im Voraus autoklaviert worden waren. Das Handling der Zellen erfolgte stets unter Verwendung von oberflächlich desinfizierten Schutzhandschuhen sowie sterilen Einmalpipetten.

##### 3.2.1.1.1 Suspensionszellen

Die in dieser Arbeit verwendeten JY-, C1R- und K-562-Zellen sowie deren Transfektanten lagen als Suspensionszellen vor. Die Kultivierung erfolgte in der Regel im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen. Als Medium wurden jeweils 50 ml des RPMI-Zellkulturmediums verwendet. Wenn größere Zellmengen benötigt wurden, wurde die Kultivierung zusätzlich auf 2L-Rollflaschen ausgedehnt. Sowohl die C1R-Zellen als auch die JY-Zellen wurden zweimal in der Woche jeweils 1 : 10 umgesetzt. Hierzu mussten vorher Zellen, die sich abgesetzt hatten, durch leichtes Klopfen gegen die Flasche resuspendiert werden. Die Transfektanten mit DLA-88\*03201-, DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Zellen wurden auf dieselbe Weise kultiviert, jedoch mit dem Unterschied, dass sie alle 2 bis 3 Tage 1 : 5 umgesetzt wurden und ihr Medium zusätzlich durch ein G418-Selektiv-Antibiotikum angereichert wurde. Neben dem MHC-Klasse-I-Gen war bei letzteren Zellen im Zuge der Transfektion ein zusätzliches Resistenzgen eingebracht worden, das eine Aminoglykosid-Phosphotransferase kodiert. Dieses Enzym versetzte die Zellen in die Lage, G418-Selektiv-Antibiotika an ihren Hydroxylgruppen zu phosphorylieren und somit deren verheerende Wirkung aufzuheben. Somit konnte garantiert werden, dass Zellen, die unter Umständen im Laufe der Zeit ihren transfizierten Genabschnitt wieder verloren haben, aussortiert wurden.

### 3.2.1.1.2 Adhärent wachsende Zellen

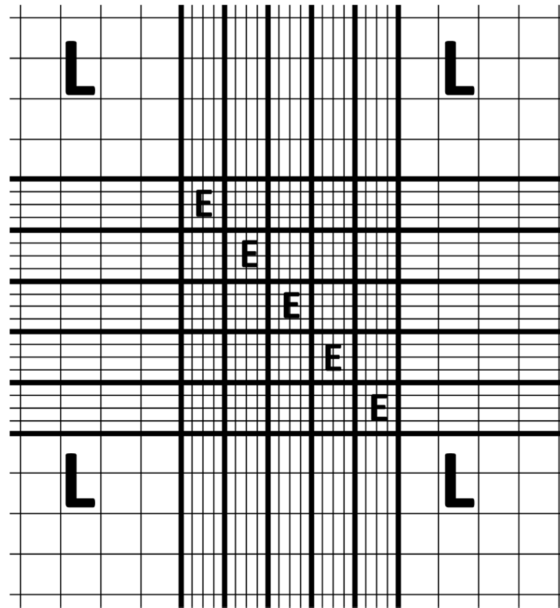
Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei adhärent wachsende Zelllinien verwendet: MDCKII- und A549-Zellen. Beide wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank in 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen kultiviert. Dabei wurden jeweils 25 ml IMDM-Zellkulturmedium verwendet. Jeweils zweimal die Woche mussten die Zellen umgesetzt werden. Hierfür wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Für einen gleichmäßigen Waschvorgang wurde durch Schwenken der Flasche in Achtertouren gesorgt. Das darauffolgende Lösen der Zellen vom Flaschengrund wurde durch die Verwendung von 4 ml Trypsin bewerkstelligt. Hierbei wurde die Trypsinlösung für 2 Min. im Zellkulturschrank auf den Zellen belassen und anschließend wieder abgenommen. Nach erneuter, meist 20-minütiger Inkubation waren die Zellen meist alle abgelöst und die Zellzahl wurde bestimmt.

### 3.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Im Rahmen dieser Arbeit musste mehrmals die Zellzahl bestimmt werden. Hierzu wurden zunächst 50 µl Zellsuspension sowie 50 µl Trypanblau in einer 96-Well-Platte mit U-Boden durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend wurde die Lösung zwischen Deckglas und Grundplatte einer Neubauer-improved-Zählkammer aufgebracht (Abbildung 5). Bei der Auszählung unter dem Lichtmikroskop wurde nur die Zellzahl innerhalb der fünf diagonalen Gruppenquadrate bestimmt sowie jeweils nur die überschneidenden Zellen der linken und unteren Begrenzungslinien mitgezählt. Der Farbstoff Trypanblau wurde zur Vitalfärbung der Zellen eingesetzt, so dass nur Zellen mit intakter Zellmembran, deren Zellinneres nicht angefärbt werden konnte, Beachtung fanden [133]. Die Berechnung der Zellzahl ergab sich unter Verwendung folgender Formel:

$Z$  = Zellzahl aus den in Abbildung mit E gekennzeichneten Feldern

$$\text{Zellzahl pro Milliliter Lösung} = Z \times 10^5$$



**Abbildung 6: Neubauer-improved-Zählkammer.**

Quelle: in Anlehnung an [134].

### 3.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um eine gleichbleibend hohe canine MHC-Expression der Transfektanten zu gewährleisten und aus Gründen der Wirtschaftlichkeit, wurde die Zeit der Zellkultivierung nach dem Auftauen bis zur weiteren Analyse der Zellen möglichst kurz gehalten. Außerdem wurden momentan nicht benötigte Zellbestände möglichst schnell eingefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### *Einfrieren:*

Als erster Schritt hierzu musste zunächst die Zellzahl der einzufrierenden Zellen innerhalb einer Zellkulturflasche bestimmt werden. Danach wurde die gewünschte Zellmenge entnommen und für 7 Min. bei 1200 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und die verbleibenden Zellen wurden resuspendiert. Anschließend wurde Einfriermedium hinzugegeben und die entstandene Zellsuspension in 1,5 ml großen Teilmengen auf 2-ml-Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden anschließend in einen Mr.-Frosty-Gefrierbehälter mit Isopropanol verbracht und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Auf diese Weise wurde ein kontrollierter Einfriervorgang von  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro Minute gewährleistet und die Zellen konnten, wenn sie für längere Zeit nicht benötigt wurden, am nächsten Tag in einen Stickstoffbehälter verbracht werden.



*Auftauen:*

Um benötigte Zellen aufzutauen, mussten diese zunächst aus den Stickstoffbehältern oder dem Gefrierschrank geholt und auf Eis in das Zellkulturlabor transportiert werden. Anschließend wurden diese in der Hand aufgetaut und in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die nachfolgende Zugabe von 10 ml IMDM- oder RPMI-Zellkulturmedium unter der Sterilbank musste tropfenweise unter Schwenken der Zellen durchgeführt werden. Danach wurden die Zellen bei 1 200 rpm für 7 Min. bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Schließlich wurden die Zellen in 5 ml IMDM/RPMI-Zellkulturmedium resuspendiert und in 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen kontrolliert und in der Regel wurden weitere 5 ml des Zellkulturmediums ergänzt. Im Falle der transgenen Zellen wurde dem Medium erst nach einer Woche das zusätzliche Selektiv-Antibiotikum G418 zugesetzt, um den Stress für die Zellen über den Auftauvorgang hinaus nicht zu vergrößern. Auf Grund der zytotoxischen Wirkung des im Einfriermedium als Kristallisationsschutz enthaltenen DMSO [135] auf aufgetaute Zellen musste darauf geachtet werden, dass die vorangegangenen Schritte nach Möglichkeit ohne Unterbrechung durchgeführt wurden.

**3.2.1.4 Transfektion**

In dieser Doktorarbeit wurde eine „stabile Transfektion“ von Zellen angestrebt. Darunter versteht man einen Vorgang, bei dem Fremd-DNA dauerhaft in das Genom einer Zielzelle eingebaut wird.

**3.2.1.4.1 Linearisierung**

Der DNA-Abschnitt mit dem caninen Allel DLA-88\*03201 wurde als Insert aushäusig durch das Unternehmen GeneArt in einen zirkulären pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor eingefügt. Es wird vermutet, dass Plasmide vor dem Einbau in das Genom einer transfizierten Zelle unspezifisch durch intrazelluläre Vorgänge geschnitten werden und die Schnittstellen in dem zu untersuchenden Genabschnitt liegen können, wodurch eine Synthese interessanter Proteine verhindert werden würde. Deshalb wurden die Vektoren vor der Transfektion linearisiert. Dies bedeutet, dass die Plasmide durch das Restriktionsenzym PvuI an spezifischer Stelle in einem uninteressanten Vektorbereich geschnitten und ihre Ringformation infolgedessen zerstört wurde.

### *Linearisierung und Fällung mittels Ethanol*

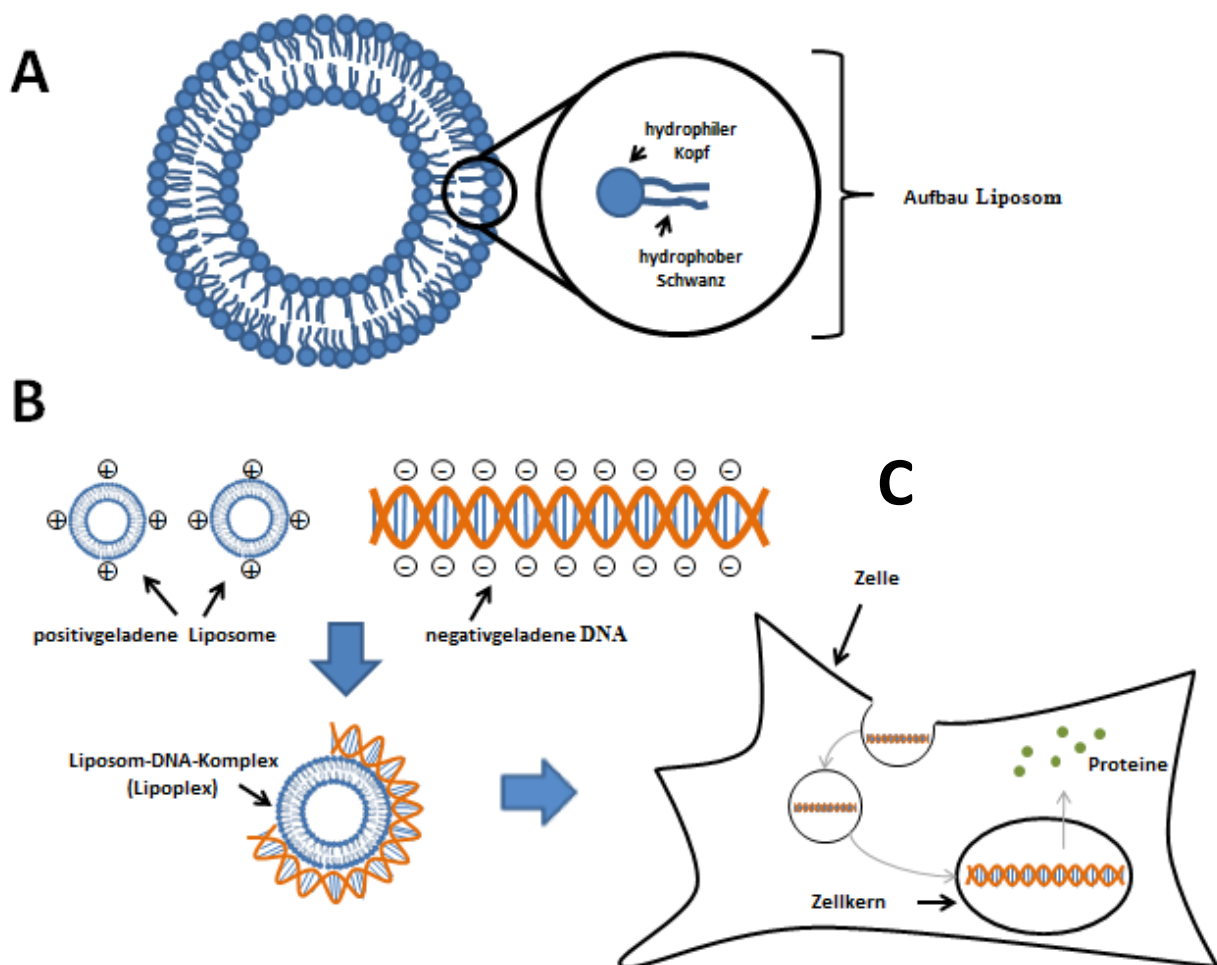
Zu Beginn der Linearisierung wurden zunächst 30 µg Plasmid-DNA mit 5 µl NEB3.1-Puffer, 0,5 µl 100 x BSA und 2 µl PvuI-Restriktionsenzym in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde mit LC-MS-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und 16 Std. bei 37 °C inkubiert. Danach wurde eine Ethanol-Fällung durchgeführt, um die linearisierte DNA aufzureinigen und zu konzentrieren. Hierfür wurden nach abgelaufener Inkubationszeit jeweils 50 µl LC-MS-Wasser, 50 µl Ammoniumacetat sowie 300 µl Ethanol p. a. zu der Probe hinzugegeben und für 30 Min. bei -20 °C inkubiert. Darauf folgend wurde für 15 Min. bei 4 °C und 14 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Sediment zweimal mit 70 % Ethanol p. a. gewaschen. Schließlich wurde die Probe bei 37 °C getrocknet, die linearisierten Plasmide in 16 µl Elutionspuffer resuspendiert und die DNA-Konzentration mittels eines NanoDrop1000-Spektralphotometers bestimmt.

### *Linearisierung und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion*

Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 13 000 rpm durchgeführt. Zu Beginn der Linearisierung wurden 50 µg Plasmid-DNA mit 50 µl NEB3.1-Puffer, 5 µl 100 x BSA und 10 µl PvuI-Restriktionsenzym in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit LC-MS-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Darauf folgte eine 3-stündige Inkubation im Wasserbad bei 37 °C. Danach wurden 500 µl Phenol/Chloroform-Lösung ergänzt, dreimal geschwenkt, gevortext und für 5 Min. bei 13 000 rpm zentrifugiert. Durch letztgenannten Schritt wurde die Probe in drei Phasen aufgeteilt. Eine organische Phenolphase unten im Reaktionsgefäß, eine zwischengelagerte Interphase mit denaturierten Proteinen sowie eine wässrige Phase mit gelöster DNA oben im Reaktionsgefäß. Die wässrige Phase wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol überführt, gevortext und für 5 Min. zentrifugiert. Die drei letzten Schritte wurden insgesamt zweimal durchgeführt, wobei die DNA von Phenolresten gereinigt wurde. Danach wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß mit 49 µl Natriumacetat pipettiert, geschwenkt und zusätzlich 1,2 ml Ethanol p. a. ergänzt, wodurch es zu einer Ausfällung der DNA innerhalb der Lösung kam. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde für 30 Min. bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in der Folge getrocknet, in 40 µl LC-MS-Wasser resuspendiert und schließlich die DNA-Konzentration mittels eines NanoDrop1000-Spektralphotometers bestimmt.

## 3.2.1.4.2 Lipofektion

Damit eine effiziente Transfektion erfolgen kann, muss die DNA in der Lage sein, die Zellmembran zu überwinden. Dies gestaltet sich als Herausforderung, da sowohl die DNA als auch die Zellmembran eine negative Polarität aufweisen und sich beide somit elektrostatisch abstoßen. Aus diesem Grund existieren in der Zellbiologie mehrere Methoden zur Transfektion von Zellen, eine davon wird als Lipofektion bezeichnet (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Darstellung der Transfektion von DNA mittels Lipofektion.

Lipide mit hydrophilem Kopf und hydrophobem Schwanz bilden kationische Liposome (A). Die positiv geladenen Liposome formen sogenannte Lipoplexe mit der negativ geladenen DNA (B). Durch die Fusion der Lipoplexe mit der negativ geladenen Zellmembran wird ein Transfer der DNA ins Zellinnere ermöglicht. Schließlich wird die DNA im Zellkern transkribiert und zur Proteinsynthese verwendet (C).

Quelle: in Anlehnung an [136].

Im Anschluss daran kann die DNA in den Zellkern gelangen und transkribiert werden, worauf eine Synthese von Fremdproteinen ermöglicht wird [136]. Im Rahmen der Lipofektion wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet, zum einen ein ScreenFectA-Transfektionskit und zum anderen ein Lipofectamine3000-Transfektionskit. Diese fusionieren in der Folge mit der Zellmembran, wodurch eine Freisetzung der DNA in das Zellinnere ermöglicht wird. Bei letztgenannter Methode formen negativ geladene DNA-Moleküle stabile Komplexe mit kationischen Liposomen und bilden somit sogenannte Lipoplexe.

#### *ScreenFectA-Transfektionskit*

In dieser Arbeit wurden sowohl C1R- als auch K562-Zellen unter Verwendung eines ScreenFectA-Transfektionskits mit einem linearisierten Expressionsvektor transfiziert, der einen DNA-Abschnitt mit dem caninen Allel DLA-88\*03201 beinhaltet. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Vor dem Beginn der eigentlichen Transfektion wurden zunächst drei 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße mit jeweils 8 µl Verdünnungspuffer bestückt. Anschließend wurde im ersten Reaktionsgefäß 0,2 µl, im zweiten 0,3 µl und im dritten 0,4 µl ScreenFectA ergänzt, der Inhalt durch vorsichtiges Streichen mit dem Finger über die Außenseite der Reaktionsgefäße durchmischt und für 5 Min. inkubiert. Währenddessen wurden jeweils drei neue 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet und in jedem 75 ng linearisierte DNA in 8 µl Dilution Buffer gelöst. Danach wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße mit den unterschiedlichen ScreenFectA-Konzentrationen in die drei Reaktionsgefäße mit gelöster DNA überführt und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Darauffolgend wurde für 25 Min. inkubiert und in der Zwischenzeit die Zellzahl der zu transfizierenden Zellen bestimmt. Nach Abschluss des Inkubationsvorganges wurden jedem Reaktionsgefäß durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren 80 µl Zellsuspension in Zellkulturmedium ( $1,25 \times 10^5$  Zellen/ml) beigefügt, jeweils 80 µl eines jeden Ansatzes in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte überführt und in den Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> verbracht. Während der Transfektion wurde den Zellen mittels der Expressionsvektoren zusätzlich ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen eingebracht, welches durch die Zugabe von Medium mit dem Antibiotikum G418 nach 3 Tagen als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Transfektion diente [137].

*Lipofectamine®3000-Transfektionskit*

In dieser Arbeit wurden sowohl C1R- als auch K562-Zellen unter Verwendung eines Lipofectamine3000-Transfektionskits mit einem linearisierten Expressionsvektor transfiziert, der einen DNA-Abschnitt mit dem caninen Allel DLA-88\*03201 beinhaltet. Als Vorbereitung wurden die zu transfizierenden Zellen ausgezählt, abzentrifugiert und in Zellkulturmedium resuspendiert ( $4 \times 10^5$  Zellen/ml Zellkulturmedium). Anschließend wurden 250 µl der Zellsuspension in die Vertiefung einer 24-Well-Platte überführt. Am darauffolgenden Tag wurden 3 µl Lipofectamine3000-Reagenz in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl Medium ohne Zusätze pipettiert und durch Vortexen gemischt. Dann wurde 1 µg linearisierte DNA, 2 µl P3000 TM-Reagenz und 50 µl Medium ohne Zusätze in einem weiteren Reaktionsgefäß vereinigt und gevortext. Anschließend wurden 50 µl der gelösten DNA in das Reaktionsgefäß mit dem verdünnten Lipofectamine3000-Reagenz pipettiert und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden 50 µl des Ansatzes zu der vorbereiteten Zellsuspension gegeben und die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank inkubiert. Während der Transfektion wurde den Zellen mittels der Expressionsvektoren zusätzlich ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen eingebracht, welches durch die Zugabe von Medium mit dem Antibiotikum G418 nach 3 Tagen als Selektionsmarker für eine erfolgreiche Transfektion diente [137].

#### 3.2.1.4.3 Elektroporation

Die Elektroporation stellt eine Methode dar, bei der DNA unter Verwendung von elektrischen Impulsen in Zellen eingebracht wird [138]. Sie wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eingesetzt, um das canine Allel DLA-88\*03201 in C1R-Zellen einzuschleusen. Vor der eigentlichen Transfektion wurde die Zellzahl der zu transfizierenden C1R-Zellen bestimmt und anschließend  $2 \times 10^7$  Zellen dreimal in kaltem RPMI-Zellkulturmedium ohne Zusätze gewaschen (1 200 rpm, 7 Min., 4 °C). Danach wurden die Zellen in 500 µl RPMI-Zellkulturmedium ohne Zusätze resuspendiert, es wurde jeweils 250 µl der Zellsuspension in vorgekühlte Elektroporationsküvetten pipettiert und 10 µg linearisierte DNA ergänzt. Die Elektroporation erfolgte unter Verwendung eines Gene-Pulser-II-Apparats, kombiniert mit einem Capacitance-Extender-Plus-Modul bei 230 Volt und 975 µF. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 8 ml RPMI-Zellkulturmedium aufgenommen und in 48-Well-Platten überführt. Einen Tag nach der Transfektion wurde zu den Zellen RPMI-Zellkulturmedium mit dem Antibiotikum G418 gegeben, wodurch auf positiv transfizierte Klone selektiert werden konnte.

### 3.2.1.5 Reklonierung

Nach erfolgreicher Transfektion von C1R- und K562-Zellen mit dem Allel DLA-88\*03201 wurden diese rekloniert. Hierfür wurde die Methode der Limiting Dilution angewendet. Dadurch konnten Klone mit einer möglichst hohen DLA-Expression vereinzelt und im Anschluss für eine Immunaффinitätschromatographie herangezogen werden. Zu Beginn wurden 200 µl der transfizierten Zellen in die Vertiefung A1 einer 96-Well-Platte mit F-Boden überführt, in die restlichen Vertiefungen wurden jeweils 100 µl RPMI-Selektivmedium pipettiert. Dann wurden die Zellen in Vertiefung A1 resuspendiert, 100 µl in die benachbarte Vertiefung A2 pipettiert, durchmischt und wiederum 100 µl aus Vertiefung A2 in Vertiefung A3 überführt. Dieses Vorgehen wurde bis zum Ende der Reihe beibehalten und die verbleibenden 100 µl Zellsuspension verworfen. Anschließend wurden mit einer Multikanalpipette 100 µl RPMI-Selektivmedium in Reihe A pipettiert, resuspendiert und 100 µl der Zellsuspension in Reihe B überführt. Dieser Ablauf wurde bis zu letzten Reihe (Reihe H) wiederholt, wobei am Ende wieder die verbleibenden 100 µl Zellsuspension verworfen wurden. Danach wurde die Platte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für ungefähr 2 Wochen im Zellkulturschrank inkubiert, wobei von Zeit zu Zeit der Flüssigkeitsspiegel der Vertiefungen kontrolliert werden musste, um eine Minderversorgung der Zellen zu verhindern. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden diejenigen Vertiefungen einer jeden Reihe zur weiteren Anzucht in 48-Well-Platten überführt, in denen bei lichtmikroskopischer Betrachtung gerade noch Zellen zu finden waren. Nach 4 bis 7 Tagen konnten die Zellen dann zur Analyse der DLA-Expression mittels Durchflusszytometrie verwendet werden.

### 3.2.1.6 FACS-Färbung zur Bestimmung der MHC-Expression

Vor dem eigentlichen Beginn des Analyseverfahrens wurde zunächst die Zellzahl der zu untersuchenden Zellen bestimmt. In der Folge wurden  $5 \times 10^5$  Zellen je Probe in vorgekühlte 5-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Um die Wirkung von proteolytischen Enzymen sowie die Internalisierung von Oberflächenmolekülen zu verringern, wurden von diesem Moment an alle vorbereitenden Maßnahmen auf Eis und mit gekühlten Reagenzien durchgeführt [139]. Anschließend wurden die Proben für 7 Min. bei 4 °C und 1 200 rpm zentrifugiert sowie zweimalig mit jeweils 4 ml FACS-Puffer gewaschen. Auf diese Weise konnte die Entfernung von Mediumbestandteilen gewährleistet werden. Im nächsten Schritt wurden jeweils 10 µl der Lösung mit Primärantikörpern und 90 µl FACS-Puffer hinzugegeben. Hierbei wurden verschie-

dene Arten von Antikörpern verwendet, je nachdem welche Oberflächenstrukturen detektiert werden sollten. Zum einen kam der Antikörper BBM.1 zum Einsatz, der spezifisch an das  $\beta_2$ -Mikroglobulin des Menschen bindet [140, 141]. Zum anderen wurde der Antikörper W6/32 verwendet, der eine Spezifität für HLA-A-, -B- und -C-MHC-Klasse-I-Moleküle besitzt [142]. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, bei der die Zellen abgedunkelt wurden, erfolgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 4 ml FACS-Puffer, mit deren Hilfe die nicht gebundenen Antikörper entfernt werden konnten. Schließlich wurde jeweils 100  $\mu$ l Sekundärantikörper in einer Konzentration von 10  $\mu$ g pro ml FACS-Puffer hinzugegeben. Verwendung fanden hierbei FITC-konjugierte F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente (FITC: *fluorescein isothiocyanate*). Nachfolgend wurde erneut für 20 Min. abgedunkelt auf Eis inkubiert. Abschließend folgten auch hier wieder zwei Waschschrte mit jeweils 4 ml FACS-Puffer zur Entfernung der nicht gebundenen Antikörper, bevor die Zellen dann in 1 ml FACS-Puffer zur FACS-Analyse aufgenommen wurden.

### 3.2.1.7 Peptidbindungsassay

Mit Hilfe eines Peptidbindungsassays wurde das Bindungsverhalten ausgewählter Peptide auf JY-, C1R- und C1R-DLA-88\*5010-Zellen untersucht. Hierfür wurde zunächst die Zellzahl der verschiedenen Zelllinien bestimmt. Danach wurden jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Medium aufgenommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Zur Überprüfung der Eigenfluoreszenz wurden jeweils 100  $\mu$ l RPMI-Zellkulturmedium mit DMSO verwendet, wohingegen für die Untersuchung der Bindungsfähigkeit der verschiedenen Peptide jeweils 100  $\mu$ l Peptidlösung in einer Verdünnung von 1 : 100 in RPMI-Zellkulturmedium eingesetzt wurden. Für jedes Peptid wurden jeweils drei Ansätze angefertigt. Folgende FITC-markierte Peptide wurden im Peptidsyntheselabor des Instituts hergestellt und zur Bindungsanalyse herangezogen (Tabelle 9):

**Tabelle 9:** Darstellung der synthetischen Peptide, die für den Peptidbindungsassay verwendet wurden.

Peptidsequenz	Quellprotein	UniProt-KB-Nummer	Position im Quellprotein	HLA-Restriktion
<b>GILGKVFTL</b>	Matrix-Protein 1 (Influenzavirus)	C6H0I6-1	58-66	A*02:01
<b>SVAEKLSKL</b>	Spatacsin	Q96JI7	1.296–1.304	
<b>YINDKGKEVL</b>	Hämagglutinin (Influenzavirus)	C6H0I3-1	182–191	
<b>DALKEKVI</b>	S-Adenosylmethionin-Synthase	P31153	220–227	B*51

Nach einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> abgedunkelt im Zellkulturschrank wurden die Zellen für 7 Min. bei 1 200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit jeweils 200 µl FACS-Puffer gewaschen, bevor sie in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und an einem FACSCalibur-Zytometer analysiert wurden (siehe 3.2.3.1). Zur Auswertung der Daten wurde wie folgt vorgegangen:

- Zunächst wurde die mittlere Fluoreszenzintensität, die sich jeweils aus den Ergebnissen der drei Ansätze eines jeden Peptides berechnete, ermittelt.
- Anschließend wurde jeweils für jede Zelllinie das Verhältnis der mittleren Fluoreszenzintensität zur Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle DALKEKVI gebildet.
- Dann wurde das Verhältnis der Negativkontrolle DALKEKVI von dem Verhältnis der jeweiligen Ansätze abgezogen.
- Schließlich wurden die Werte, die für die C1R-Zellen erzielt wurden, von denen der C1R-DLA-88\*50101-Zellen abgezogen, wodurch die DLA-88\*50101-Bindungsfähigkeit ermittelt werden konnte.
- Zur Analyse der Bindungsfähigkeit auf HLA-A\*02:01 wurde die Bindung von GILGFVFTL auf HLA-A\*02:01 als 100 % betrachtet.
- Zur Analyse der Bindungsfähigkeit auf DLA-88\*50101 wurde die Bindung von SVAEKLSKL auf DLA-88\*50101 als 100 % betrachtet.



### 3.2.1.8 Peptidsynthese

Die synthetischen Peptide wurden alle im institutseigenen Peptidsyntheselabor mittels Fmoc-Chemie hergestellt. Die Peptide, die für den Peptidbindungsassay verwendet wurden, wurden jeweils FITC-markiert. Die Peptide, die der Validierung identifizierter, natürlicher Liganden dienten, wurden jeweils an der Aminosäure Valin isotopenmarkiert.

## 3.2.2 Arbeiten mit Influenzaviren

### 3.2.2.1 Virusanzucht

Für die Vermehrung der Influenzaviren wurden sowohl A-549- als auch MDCKII-Zellen verwendet. Die Zelllinien mussten hierfür zunächst mit Hilfe von Trypsin abgelöst (gemäß 3.2.1.1.2.) und die Zellzahl bestimmt werden. Dann wurden jeweils  $1,2 \times 10^7$  Zellen in acht 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen überführt und für 24 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 25 ml IMDM-Medium im Zellkulturschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen im S2-Labor dreimal mit jeweils 5 ml Infektions-PBS gewaschen. Die Infektion der Zellen fand mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,001, unter Verwendung einer Influenza-A-Virussuspension, statt. Dies bedeutete die Verwendung von 5 ml Virussuspension mit  $2 \times 10^4$  FFU (*focus forming units*) für  $2 \times 10^7$  Zellen. Nach halbstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Virussuspension abgenommen und 20 ml BA-IMDM-Inkubationsmedium mit 1,2 µl Versene-Trypsin pro Milliliter Medium beigelegt. Anschließend wurde erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Eine regelmäßige visuelle Begutachtung der infizierten Zellrasen per Mikroskop war in der Folge von Nöten, um den Fortschritt des zytopathischen Effekts einschätzen zu können. Konnte nach circa 2–3 Tagen ein zytopathischer Effekt von 50 % ausgemacht werden, wurden die Überstände in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und für 10 Min. bei 4 000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden diese in einer 200-ml-Zellkulturflasche vereinigt und jeweils zwei 60-µl-Aliquots gezogen, die in 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei –80 °C zur weiteren Lagerung eingefroren wurden. Der restliche vereinigte Überstand wurde entweder in Teilportionen in 50-ml-Falcon-Röhrchen bei –80 °C gelagert oder sofort für die nachfolgende Ultrazentrifugation auf Eis bereitgestellt.

Vor jeder Ultrazentrifugationseinheit wurden die Einsätze des TFT-Rotors-45.49 jeweils mit PBS gespült und auf Eis vorgekühlt. Beim Verteilen des Überstandes musste darauf geachtet

werden, dass die Einsätze jeweils mindestens mit 40 ml Inhalt befüllt wurden und dass zum Gewichtsausgleich immer die gleiche Teilmenge pro Rotoreinsatz verwendet wurde. Nach der 6-stündigen Ultrazentrifugation bei 41 000 rpm und 4 °C wurden jeweils zwei 200-µl-Aliquots aus den Einsätzen entnommen und bei –80 °C in 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen eingefroren. Anschließend wurden die verbleibenden Überstände verworfen und jeweils 1 ml Infektions-PBS zu dem Pellet aus Viruspartikeln hinzugefügt. Wichtig war hierbei, durch eine geeignete Positionierung der Rotoreneinsätze sicherzustellen, dass die jeweiligen Pellets ausreichend benetzt und somit gelöst wurden. Nach einer 15-minütigen Inkubation im Kühlschrank bei 4 °C wurden die Pellets abpipettiert und in einem 15-ml-Falcon-Röhrchen vereinigt, aus dem zwei 10-µl-Aliquots in 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße gezogen wurden. Anschließend wurde das verbleibende Viruskonzentrat in 1 ml großen Teilmengen auf 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und mit den restlichen Aliquots bei –80 °C gelagert.

### **3.2.2.2 Bestimmung des Virustiters (Avicel Plaque Assay)**

#### **3.2.2.2.1 Verdünnung und Infektion**

Zu Beginn wurden MDCKII-Zellen wie unter 3.2.1.1.2. beschrieben abgelöst und die Zellzahl wurde bestimmt. Im Anschluss wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in eine 96-Well-Platte mit F-Boden überführt. Die Zellen wurden in IMDM-Medium für 16–24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis zum Erreichen eines annähernd konfluenten Zustandes. Am darauffolgenden Tag wurden die Aliquots, welche bei der Virusanzucht entnommen wurden, im S2-Labor aufgetaut und in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen auf Eis je nach angenommener Konzentration verdünnt. Hierbei wurde wie folgt vorgegangen: Die Aliquots der Anzucht wurden 1 : 100 und 1 : 1 000, die des konzentrierten Pellets 1 : 5 000 und 1 : 10 000 und die des Überstandes der Ultrazentrifugation 1 : 1 in Infektions-PBS verdünnt (Abbildung 8). Dann wurden jeweils 100 µl Infektions-PBS in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte mit U-Boden vorgelegt und 50 µl einer der Virusverdünnungen pro Vertiefung in Reihe A ergänzt, so dass je Verdünnung drei technische Replikate entstanden. Anschließend wurde mit einer Multikanalpipette jeweils dreimal in Reihe A auf- und abpipettiert und jeweils 50 µl der Virusverdünnungen in Reihe B überführt. Dort wurde erneut durch dreimaliges Auf- und Abpipettie-

ren durchmischt und somit für eine 1-zu-3-Verdünnung im Vergleich zur vorherigen Reihe gesorgt.

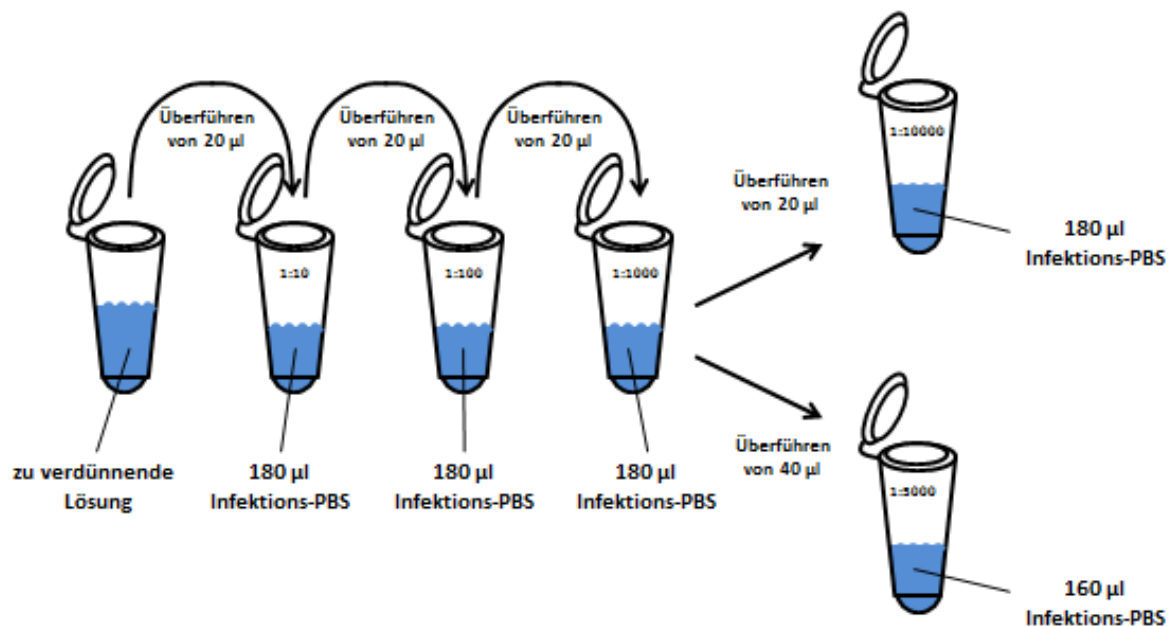


Abbildung 8: Pipettierschema zur Herstellung einer Verdünnungsreihe.

Nach einem Pipettenspitzenwechsel wurden 50 µl aus Reihe B in Reihe C pipettiert und das oben beschriebene Pipettierschema für die folgenden Reihen gleichermaßen fortgesetzt. Nach Erreichen der untersten Reihe wurden die überschüssigen 50 µl Virusverdünnung verworfen. Nun wurde das Medium der tags zuvor ausgesäten MDCKII-Zellen ausgeworfen und dreimal mit Infektions-PBS gewaschen. Hierbei musste, um Zellverluste zu vermeiden, darauf geachtet werden, dass die Waschlösung nicht direkt auf den Zellrasen aufpipettiert wurde, sondern eher an die seitlichen Wände der jeweiligen Vertiefungen. Daraufhin wurden jeweils 50 µl der Virusverdünnungen mit der Multikanalpipette von niedriger zur hohen Konzentration auf die MDCKII-Zellen aufgebracht. Das heißt, es wurde jeweils bei Reihe H begonnen und sich weiter bis zur Reihe A vorgearbeitet. Die Zellen wurden dann bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Während alle vorangegangenen Schritte, abgesehen von den Inkubationsschritten, auf Eis durchgeführt werden mussten, konnte nun auf dieses verzichtet werden. Nach Ablauf einer Stunde wurde die Inkubation der Zellen unterbrochen und jede Vertiefung mit 100 µl Avicel-Mix ergänzt. Anschließend wurde die Inkubation für einen Zeitraum von 22 bis 30 Std. fortgesetzt.

#### 3.2.2.2.2 Fixierung

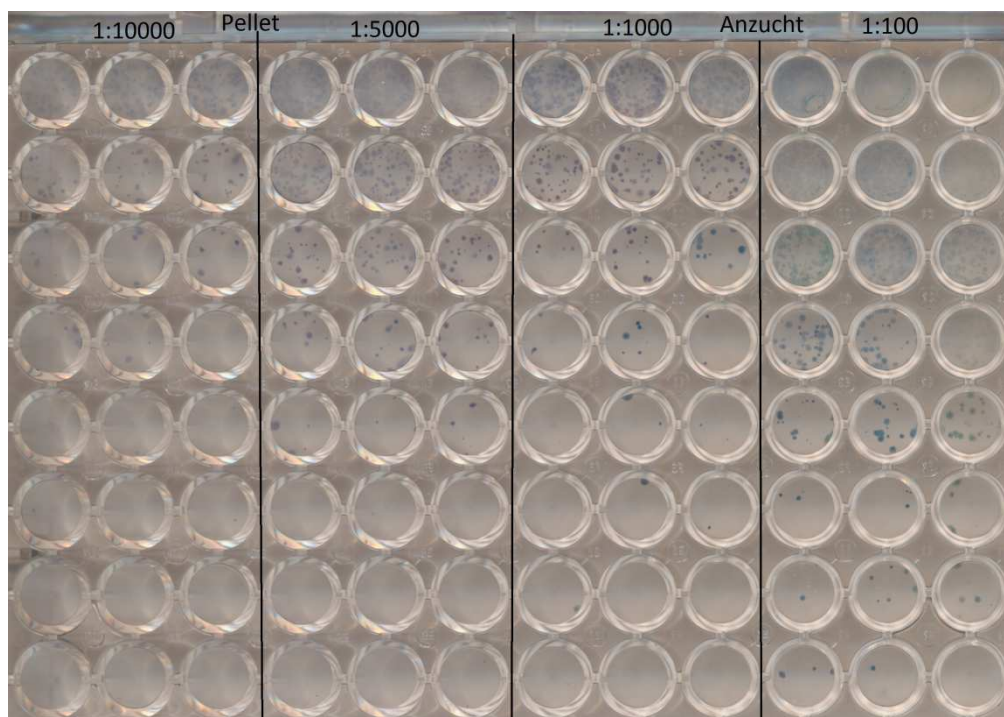
Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Avicel-Mix ausgeworfen und die Zellen wurden zweimal hintereinander mit 100 µl PBS je Vertiefung gespült. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von jeweils 100 µl Roti-Histofix pro Vertiefung bei einer 30-minütigen Inkubation bei 4 °C im Kühlschrank fixiert. Danach wurde die Roti-Histofix-Lösung ausgeworfen und es wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen mit PBS bedeckt und dadurch vor dem Austrocknen geschützt, bevor, nach äußerer Desinfektion der Titrationsplatten, die weiteren Arbeitsschritte im S1-Labor fortgesetzt wurden.

#### 3.2.2.2.3 Färbung

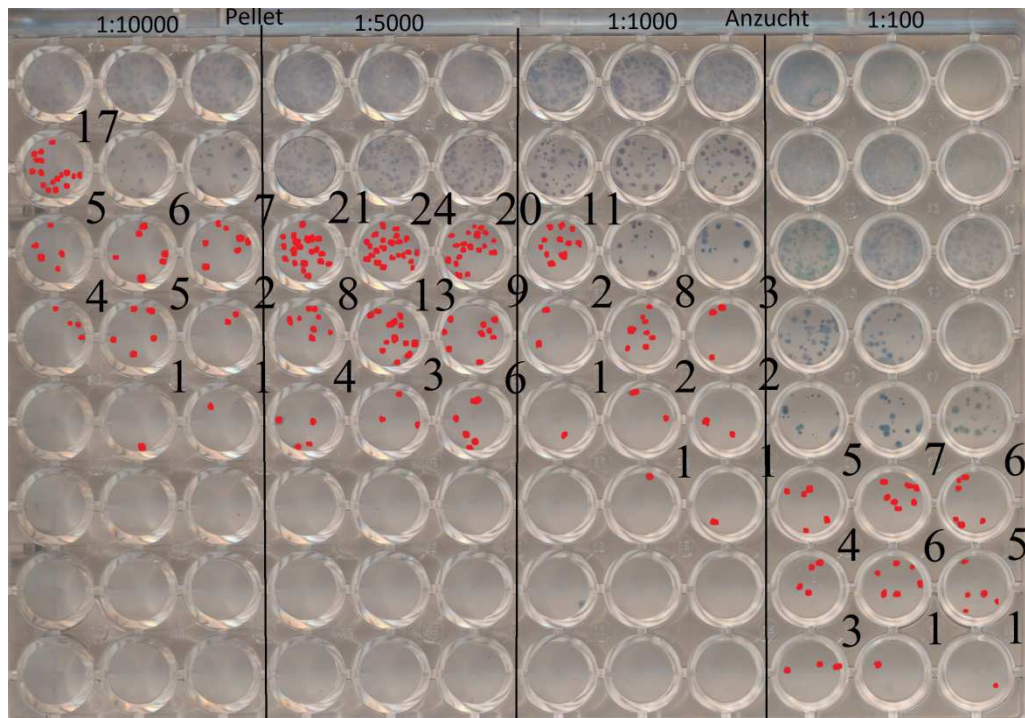
Vor der Färbung der Titerplatten wurde zunächst das PBS aus den Titerplatten ausgeworfen. Dann wurde pro Vertiefung 100 µl Triton X-100-Lösung (0,3 %) hinzugegeben und für 10 Min. bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch inkubiert, wodurch die Zellen permeabilisiert wurden. Anschließend wurde die Triton X-100-Lösung ausgeworfen und je Vertiefung 100 µl FBS-Lösung (10 %) ergänzt. Es folgte ein weiterer 10-minütiger Inkubationsschritt auf dem Schütteltisch. Danach wurde die FBS-Lösung ausgeworfen und je Vertiefung 50 µl Primärantikörper-Lösung aufgebracht. Hierbei handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper, der an das Nukleoprotein von Influenza-A-Viren bindet (MCA-400) und in einem Verhältnis von 1 : 10 000 in Tween-20-Lösung mit FBS Verwendung fand. Nach einstündiger Inkubation auf dem Schütteltisch wurde die Antikörper-Lösung ausgeschlagen und die Zellen durch eine 5-minütige Inkubation auf dem Schütteltisch mit je 100 µl Tween-20-Lösung (0,1 %) pro Vertiefung gewaschen. Im Verlaufe des Waschschrattes wurde bereits der durch Peroxidase konjugierte Anti-Mouse-IgG-Sekundärantikörper im Verhältnis von 1 : 1 000 in Tween-20-Lösung mit FBS verdünnt, so dass im Anschluss, nachdem die Tween-20-Lösung ausgeworfen wurde, sofort 50 µl der Sekundärantikörper-Lösung pro Vertiefung auf die Zellen gegeben werden konnten. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Titerplatten auf dem Schütteltisch, bevor die Zellen dann erneut dreimal mit Tween-20-Lösung gewaschen wurden. Am Ende erfolgte die Zugabe von 50 µl TrueBlue-Peroxidasesubstrat pro Vertiefung und die Zellen wurden, nach 10-minütiger Inkubation auf dem Schütteltisch, abschließend dreimal mit zweifach destilliertem H<sub>2</sub>O für eine Minute gewaschen. Nachdem die Titerplatten an der Luft getrocknet waren, standen sie zur Auswertung bereit.

#### 3.2.2.2.4 Auswertung

Die fertig gefärbten Titerplatten wurden zur weiteren Auswertung mit einem Flachbettscanner erfasst und mit einer Auflösung von 600 DPI unter Verwendung der Grafiksoftware Paint auf dem Computer dargestellt. Das Bild einer eingescannten Titerplatte ist in Abbildung 9 zu sehen. Das Computerprogramm ermöglichte die optische Untersuchung einer jeden Vertiefung, wobei die viralen Foci jeweils markiert und deren Anzahl bestimmt wurde. Die Auszählung innerhalb einer Reihe wurde immer an der Vertiefung begonnen, die den höchsten Verdünnungsgrad in Kombination mit einer Bildung von Foci aufwies und wurde dann für die beiden folgenden Vertiefungen mit niedrigeren Verdünnungen fortgesetzt. Wichtig war hierbei, dass nur valide Werte berücksichtigt wurden. Das heißt, dass pro Titrationsreihe nur die drei aufeinanderfolgenden Vertiefungen verwendet wurden, deren Anzahl an Foci äquivalent zu dem Verdünnungsgrad zu oder abnahmen. Abbildung 10 zeigt die Titerplatte aus Abbildung 9 nach Auszählung und Markierung der Foci pro Vertiefung.



**Abbildung 9:** Scan einer 96-Well-Platte nach Durchführung eines Avicel Plaque Assay.



**Abbildung 10:** Beispielhafte Auszählung und Markierung der Foci je Vertiefung anhand der 96-Well-Platte aus Abbildung 9.

Die Anzahl an Foci wurden anschließend in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel übertragen und unter Berücksichtigung der vorausgegangenen Verdünnungen die Menge an Focus-bildenden Einheiten (*focus forming units*, FFU) pro Milliliter bestimmt. Für die erste Reihe der Titerplatte wurden hierzu beispielsweise die ausgezählten Foci je Vertiefung mit dem Faktor 60 multipliziert. Dieser ergab sich aus der vorausgegangenen 1-zu-3-Verdünnung der vorverdünnten Virusproben vor der Infektion (Faktor 3), der weiteren 1-zu-3-Verdünnung durch Zugabe des Avicel-Mix (Faktor 3) und der abschließenden Angleichung des Ergebnisses von FFU/150 µl auf FFU/ml (Faktor 6,67). Für die zweite Reihe und alle folgenden wurde zusätzlich mit ansteigender Verdünnung pro Reihe ein Faktor von 3 mit einbezogen. Dies bedeutete beispielsweise für Reihe 2, dass zusätzlich mit 3 multipliziert wurde, für Reihe 3 mit 9 und so weiter. Dann wurden die Ergebnisse innerhalb einer Verdünnungsreihe gemittelt und mit dem Faktor der Vorverdünnungen multipliziert, das heißt beispielsweise eine Multiplikation mit 100 bei einer 1-zu-100-Vorverdünnung. Schließlich wurde pro Verdünnungsreihe die Anzahl der Foci je Milliliter aus den Ergebnissen von drei technischen Replikaten gemittelt und der Virustiter als Logarithmus zur Basis 10 angegeben. Tabelle 10 zeigt die Vorgehensweise zur Bestimmung des Virustiters anhand der ersten Verdünnungsreihe der 96-Well-Titerplatte, die auch schon in Abbildung 9 und 10 verwendet wurde.

**Tabelle 10: Bestimmung des Virustiters**

Reihe	Focusanzahl	Faktor	FFU
1		60	
2	17	180	3 060
3	5	540	2 700
4	4	1 620	6 480
5		4 860	
6		14 580	
7		43 740	
8		131 220	
<b>Mittelwert</b>			4 080
<b>Verdünnungsfaktor 10 000</b>			40 800 000
<b>LOG10</b>			7,6106602

### 3.2.2.3 Intrazelluläre FACS-Färbung

#### 3.2.2.3.1 Untersuchung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen

Um herauszufinden, ob sich C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit Influenzavirus RB1 infizieren lassen, wurden die Zellen am Vortag ausgezählt und jeweils  $1,6 \times 10^7$  Zellen in 16 ml RPMI-Zellkulturmedium gleichmäßig auf sieben Vertiefungen einer 24-Well-Platte verteilt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in das S2-Labor verbracht, jeweils in 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und 2 ml PBS wurde ergänzt. Anschließend wurde für 5 Min. bei 1 200 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Letztgenannter Waschschritt wurde noch ein weiteres Mal durchgeführt und die Zellen in 2 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen der Proben 3, 4, 5, 6, 7 und 8 mit jeweils  $2 \times 10^6$  FFU in 1 ml Infektions-PBS (MOI von 1) infiziert und für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Proben 1 und 2 wurde jeweils nur 1 ml Infektions-PBS verwendet. Danach wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen jeweils in 1 ml BA-RPMI-Inkubationsmedium mit 1,2 µl Trypsin pro Milliliter Lösung aufge-

nommen. Proben 1, 2, 3 und 4 wurden dann für 9 Std., Proben 5 und 6 für 12 Stunden und Proben 7 und 8 für 15 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer 24-Well-Platte inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden sämtliche Proben in 4-ml-FACS-Röhrchen überführt und für 10 Min. bei 1 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen wurden einmal mit 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die PBS-Lösung abpipettiert und die Zellen in 1 ml Fixations-/Permeabilisationsreagenz durch Vortexen resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 45 Min. bei Raumtemperatur, bei der die Zellen abgedunkelt wurden. Von da an konnten alle Schritte im S1-Labor stattfinden, wobei die Zellen stets gekühlt werden mussten, damit deren Permeabilisation aufrechterhalten werden konnte. Nach einer Zentrifugation, die wie alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte für 7 Min. bei 1 200 rpm und 4 °C erfolgte, wurden die Zellen zweimal mit 2 ml Perm/Wash-Lösung gewaschen. Anschließend wurde für 15 Min. mit 75 µl CD 16/32-Antikörper (1 : 4 in FACS-Puffer) abgedunkelt bei 4 °C inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde wie folgt vorgegangen:

- Zugabe von 800 µl MCA-400-Primärantikörper (1 : 100 in FACS-Puffer), der an das Influenza-A-Nukleoprotein bindet, zu Proben 1, 2, 3, 5 und 7
- Zugabe von 800 µl FACS-Puffer zu Proben 4, 6 und 8
- einstündige Inkubation abgedunkelt bei 4 °C und Vortexen im 15-minütigen Abstand
- zweimaliges Waschen mit 2 ml FACS-Puffer
- Zugabe von 100 µl Sekundärantikörper Anti-Mouse-IgG-FITC (1 : 100 in FACS-Puffer)
- 45-minütige Inkubation abgedunkelt bei 4 °C
- zweimaliges Waschen mit 2 ml FACS-Puffer
- Aufnahme in 200 µl FACS Lysing Solution
- Analyse der Proben wie unter 2.2.3.1. beschrieben mit Hilfe eines FACSCalibur-Zytometers

#### 3.2.2.3.2 Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen ohne Trypsin

Zur In-vitro-Infektion von Zellen wird dem Zellkulturmedium in der Regel das Enzym Trypsin hinzugefügt, wodurch das virale Oberflächenprotein Hämagglutinin proteolytisch aktiviert und somit eine Virusreplikation ermöglicht wird [143]. Trypsin beschränkt seine proteolytische Tätigkeit nicht nur auf die Spaltung des Hämagglutinins in seine Untereinheiten, sondern kann auch andere Oberflächenmoleküle schneiden, wie zum Beispiel MHC-Komplexe,



und deren Vorkommen somit mindern. Um eine möglichst große Ausbeute an Peptidliganden bei der Immunaффinitätschromatographie zu erzielen, wird jedoch eine möglichst große Menge an MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche benötigt. Da einige Zelllinien über eine endogene Proteaseexpression verfügen und somit auch ohne die Verwendung von Trypsin mit Influenza-A-Viren infiziert werden können, wurde durch den Einsatz einer intrazellulären FACS-Färbung überprüft, ob sich Zellen, die mit dem Allel DLA-88\*50101 transfiziert wurden, auch ohne die Verwendung von Trypsin effizient infizieren lassen. Die intrazelluläre FACS-Färbung stellt ein Verfahren dar, bei dem monoklonale Antikörper eingesetzt werden, um intrazelluläre Antigene zu identifizieren.

Als Vorbereitung wurden C1R-DLA-88\*50101-Zellen ausgezählt und  $3 \times 10^6$  Zellen für die Scheininfection (Si), sowie  $9 \times 10^6$  Zellen für die verschiedenen Infektionsansätze in jeweils ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde für 10 Min. bei 4 °C und 1 000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen jeweils in 0,5 ml PBS resuspendiert. Insgesamt wurde dieser Waschschrift dreimal durchgeführt. Von diesem Zeitpunkt an wurde im S2-Labor weiter gearbeitet. Die Überstände wurden mit der Pipette abgenommen und 60 µl PBS in das Si-Reaktionsgefäß überführt ( $5 \times 10^7$  Zellen/ml). Die Zellen des anderen Reaktionsgefäßes wurden mit  $1,8 \times 10^7$  FFU (MOI von 2) infiziert und auf ein Volumen von 180 µl mit PBS aufgefüllt ( $5 \times 10^7$  Zellen/ml). Dann wurden beide Reaktionsgefäße für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde unterschiedlich vorgegangen:

#### *Probe 1: Scheininfection*

- 60 µl Scheininfectionsansatz in 48-Well-Platte; Zugabe von 200 µl erwärmtem BA-RPMI-Inkubationsmedium mit 1,2 µl Trypsin pro Milliliter Lösung; halbstündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>; Abzentrifugieren (1 000 rpm; 10 Min.; 24 °C); Resuspendieren in 2,9 ml erwärmtem RPMI-Zellkulturmedium; Inkubation für 11 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### *Probe 2: Inkubation ohne Trypsin*

- Überführung von 60 µl aus Infektionsansatz in 48-Well-Platte; Zugabe von 2,9 ml RPMI-Zellkulturmedium; Inkubation für 11,5 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

*Proben 3 und 4: Inkubation mit Trypsin*

- Jeweils 60 µl aus Infektionsansatz in 48-Well-Platte; Zugabe von 200 µl erwärmtem BA-RPMI-Inkubationsmedium mit 1,2 µl Trypsin pro Milliliter Lösung; halbstündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>; Abzentrifugieren (1 000 rpm; 10 Min.; 24 °C); Resuspendieren in 2,9 ml erwärmtem RPMI-Zellkulturmedium; Inkubation für 11 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben jeweils in ein 4-ml-FACS-Röhrchen überführt und für 10 Min. bei 1 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen wurden einmal mit 4 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die PBS-Lösung abpipettiert und die Zellen in 1 ml Fixations-/Permeabilisationsreagenz durch Vortexen resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 45 Min. bei Raumtemperatur, bei der die Zellen abgedunkelt wurden. Danach wurde jede Probe auf drei 4-ml-FACS-Röhrchen aufgeteilt, so dass jeweils drei technische Replikate entstanden. Von da an konnten alle weiteren Schritte wieder im S1-Labor stattfinden, wobei die Zellen stets gekühlt werden mussten, damit deren Permeabilisation aufrechterhalten werden konnte. Nach einer Zentrifugation, die wie alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte für 7 Min. bei 1 200 rpm und 4 °C erfolgte, wurden die Zellen in eine 96-Well-Platte überführt und dreimal mit 200 µl Perm/Wash-Lösung gewaschen. Anschließend wurde für 20 Min. mit 100 µl IgG-FcR-Blockierungsreagenz bei 4 °C inkubiert, wobei die unspezifischen Bindungsstellen der im nächsten Schritt verwendeten Primärantikörper blockiert wurden. Dann wurde wie folgt vorgegangen:

- 100 µl MCA-400-Primärantikörper wurden zu den Replikaten der zweiten und dritten Probe hinzugefügt (1 : 100 in FcR-Blockierungslösung).
- 100 µl eines Anti-HLA-A3-Antikörpers als Isotypkontrolle wurden zum ersten und zweiten Replikat der vierten Probe hinzugefügt, in einer Konzentration von 10 mg/L FcR-Blockierungslösung.
- Zum dritten Replikat der vierten Probe wurden 100 µl FcR-Blockierungslösung hinzugefügt.

Es folgte eine einstündige Inkubation bei 4 °C, in deren Anschluss die Zellen zweimal mit 200 µl Perm/Wash-Lösung gewaschen wurden. Danach wurden jeweils 100 µl Sekundärantikörper-Lösung zu jedem Replikat hinzugegeben, wobei ein Anti-Mouse-IgG-FITC-Antikörper Verwendung fand (1 : 100 in FACS-Puffer). Die Zellen wurden für 45 Min. inkubiert und anschließend erneut in 200 µl Perm/Wash-Lösung gewaschen, bevor sie schließlich in 300 µl

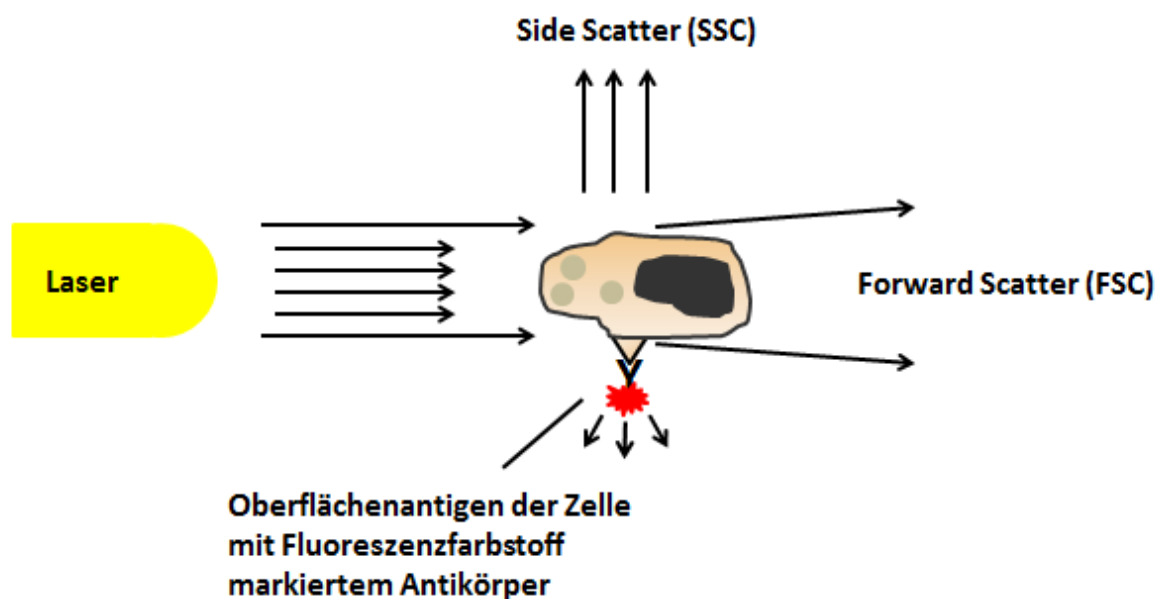
FACS-Lysing-Solution-Lösung aufgenommen wurden. Die Analyse der Proben wurde, wie unter 2.2.3.1. beschrieben, mit Hilfe eines FACSCalibur-Zytometers durchgeführt.

### 3.2.3 Analytische Methoden

#### 3.2.3.1 Durchflusszytometrie

##### *Theoretischer Hintergrund*

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, das die Analyse und Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen ermöglicht. Innerhalb des Durchflusszytometers werden die zu analysierenden Zellen mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit durch eine Messküvette geleitet und dadurch vereinzelt.



**Abbildung 11:** Funktionsweise eines Durchflusszytometers.

Die zu analysierenden Zellen passieren jeweils einen Laserstrahl. Hierbei kann durch die Umwandlung des entstehenden Streulichts in elektrische Signale jede Zelle genauer untersucht werden. Das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) stellt hierbei die seitliche Ablenkung des Lichtstrahls dar und gibt Aufschluss über die intrazelluläre Beschaffenheit und Granularität der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) repräsentiert die Beugung des Lichts im flachen Winkel und erlaubt die Beurteilung der Zellgröße. Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht die Detektion von Zellen und Zellbestandteilen, die mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert wurden.

Quelle: in Anlehnung an [139, 144].

Während ihrer Passage wird die einzelne Zelle von einem Laserstrahl erfasst. Dabei wird das Licht je nach Beschaffenheit der Zelle gestreut. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) liefert hierbei Informationen über die Größe der analysierten Zellen, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) gibt Aufschluss über deren Granularität (Abbildung 11). Die Detektion dieser zwei Größen erlaubt somit, zum Beispiel kleinere Partikel wie Zelltrümmer von vollständigen Zellen zu unterscheiden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Form des Zytometers, einem sogenannten FACSCalibur-Gerät (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) können zusätzlich bestimmte Strukturen auf der Zelloberfläche oder innerhalb von Zellen sichtbar gemacht werden. Dies geschieht durch die spezifische Bindung von Primärantikörpern und der nachfolgenden Markierung mittels eines Sekundärantikörpers, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Fluoreszenzfarbstoffe besitzen die Eigenschaft, eintreffendes Licht teilweise zu resorbieren und wieder in einer anderen Wellenlänge abzugeben. Das emittierte Licht kann innerhalb des Zytometers durch verschiedene Detektoren, in diesem Fall ein FL-1-Detektor, erfasst und in ein optisches Signal umgewandelt werden. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes steht dabei in Zusammenhang mit der Menge an gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen auf der Zelloberfläche [139] oder, bei intrazellulären Färbemethoden, innerhalb der Zellen. Je größer die Menge an gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen ist, desto größer ist die gemessene Fluoreszenzintensität.

#### 3.2.3.1.1 Durchführung

Nach der Aufbereitung der Zellen wurden diese mit Hilfe des Computerprogramms Cell Quest Pro an einem FACSCalibur-Zytometer analysiert und mittels des Programms FlowJo 10.0.7. visualisiert. Hierbei wurde die zu analysierende Zellzahl auf 5 000 Zellen beschränkt. Es wurden die folgenden Einstellungen verwendet (Tabelle 11 und 12):

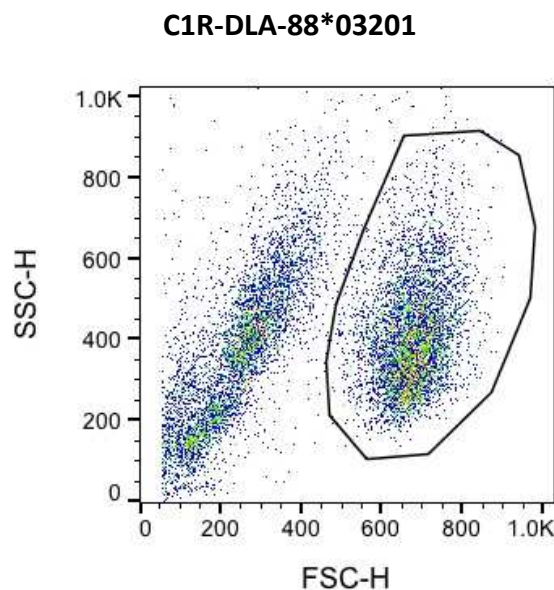
**Tabelle 11:** Einstellungen zur Bestimmung der MHC-Expression und bei der intrazellulären FACS-Färbung.

Detector	Voltage	AmpGain	Mode
<b>FSC</b>	E-1	4,99	Lin
<b>SSC</b>	458	1.00	Lin
<b>FL-1</b>	421	1.00	Log

**Tabelle 12:** Einstellungen für den Peptidbindungsassay

Detector	Voltage	AmpGain	Mode
<b>FSC</b>	E-1	4,99	Lin
<b>SSC</b>	480	1.00	Lin
<b>FL-1</b>	510	1.00	Log

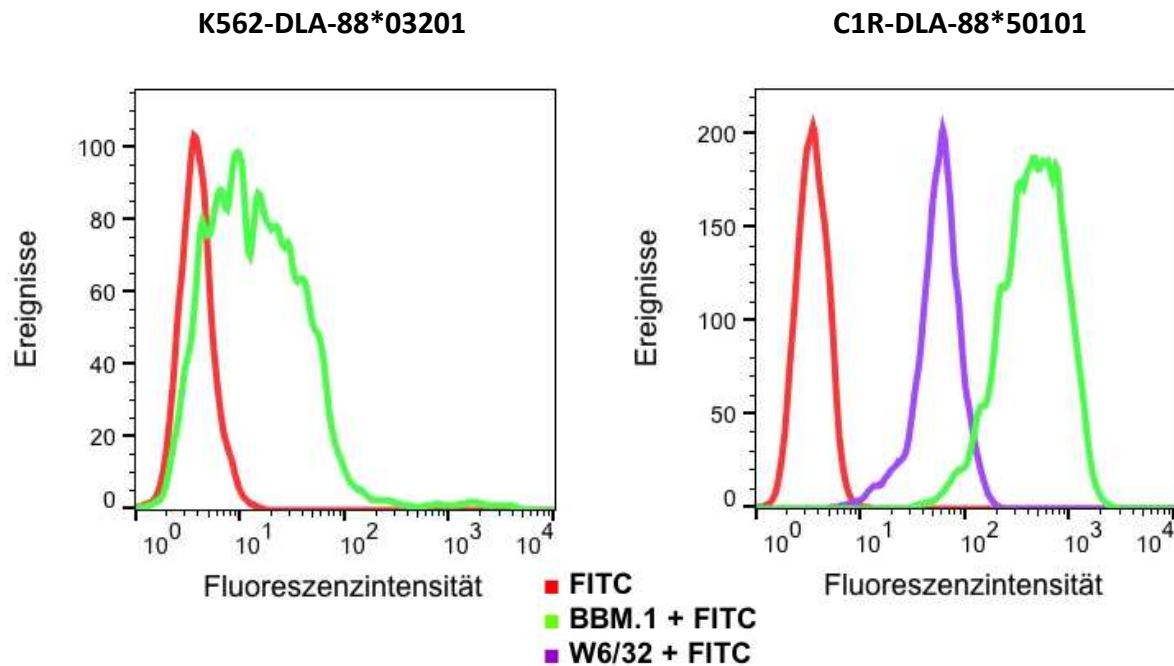
Durch die gemeinsame Darstellung der Parameter SSC und FSC in einem Dot-Plot-Schaubild bestand für jede Probe die Möglichkeit, bestimmte Bereiche innerhalb des Messspektrums durch das Setzen eines Fensters (dem sogenannten Gate) zu fokussieren und somit die Reinheit der zur Analyse herangezogenen Zellen zu steigern (Abbildung 12).



**Abbildung 12:** Exemplarische Darstellung eines Dot Plot von C1R-DLA-88\*03201-Zellen.

Hierbei wurden die untersuchten Zellen nach ihrem Seitwärtsstreulicht (SSC) und ihrem Vorwärtsstreulicht (FSC) dargestellt. In der Folge konnte die Reinheit der zu analysierenden Zellen erhöht werden, indem durch die Verwendung eines Gates Zelltrümmer oder zu stark granulierten Zellen von der weiteren Darstellung in einem Histogramm ausgeschlossen wurden. In diesem Fall liegen 64,71 % der Probe innerhalb des eingegrenzten („gegateten“) Bereichs.

In der Folge konnte dann der Bereich des besonderen Interesses in einem weiteren Schaubild, dem sogenannten Histogramm, einer genaueren Untersuchung unterzogen werden. Das Histogramm wurde in diesem Fall durch die Aufzeichnung der Häufigkeit bestimmter Fluoreszenzintensitäten, die mit dem FL-1-Detektor gemessen wurden, charakterisiert. Die Stärke der Fluoreszenz korrelierte hierbei jeweils mit der Menge an MHC-gebundenen Primärantikörpern auf der Zelloberfläche, da diese, wie vorher bereits erwähnt, zusätzlich durch FITC-gekoppelte Sekundärantikörper markiert wurden (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** Exemplarische Darstellung der Histogramme ausgewählter K562-DLA-88\*03201- und C1R-DLA-88\*50101-Zellen zur Bestimmung der DLA-Expression.

Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität der Ansätze nach Inkubation mit verschiedenen Primärantikörpern und nachfolgender Zugabe von FITC-markiertem Sekundärantikörpern. Die rote Kurve zeigt die Eigenfluoreszenz der Zellen unter ausschließlicher Verwendung von FITC-markierten Sekundärantikörpern. Die grüne Kurve stellt die Fluoreszenz der Zellen nach Inkubation mit BBM.1 als Primärantikörper dar. Dieser Antikörper kann sowohl an canine als auch an humane MHC-Komplexe binden. Die lila Kurve veranschaulicht die Fluoreszenz der Zellen nach Verwendung des W6/32-Antikörpers, der nur an humane MHC-Moleküle bindet. Bei den transfizierten K562-Zellen genügte die Verwendung von BBM.1 als Primärantikörper zur Analyse der DLA-Expression, da diese Zelllinie keine eigenen MHC-Moleküle auf der Oberfläche ausbildete. Die transfizierten C1R-Zellen hingegen mussten sowohl mit BBM.1- als auch mit W6/32-Antikörpern inkubiert werden, da diese über eine eigene, humane MHC-Expression verfügten.

### 3.2.3.2 Isolation von viralen/zellulären DLA- und HLA-Liganden

#### 3.2.3.2.1 Vorbereitung Infektionsansatz

Für die nachfolgende Immunaффinitätschromatographie wurden sowohl C1R-DLA-88\*50101- als auch JY-Zellen verwendet. Die Kultivierung der C1R-DLA-88\*50101- und JY-Zellen wurde in 2L-Rollflaschen durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden pro Zelllinie  $2 \times 10^9$  Zellen entnommen und in Sorvall-Flaschen überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation in einer Sorvall-Zentrifuge bei 1 120 rpm und 4 °C wurde der Überstand abgekippt und die Zellpellets wurden mit PBS resuspendiert. Dann wurden die Zellen so aufgeteilt, dass jeweils  $1 \times 10^9$  Zellen für den Infektionsansatz und  $1 \times 10^9$  für den Scheininfektionsansatz in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen verbracht wurden. Im Anschluss folgten drei Waschschrirte, bei denen jeweils zentrifugiert (1 200 rpm, 7 min, 4 °C), der Überstand abgekippt und wieder mit 50 ml PBS resuspendiert wurde. Die Zellen wurden auf Eis ins S2-Labor verbracht. Dort wurde der Infektionsansatz mit einer MOI von 2 für 1 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 10 ml Infektions-PBS inkubiert. Der Scheininfektionsansatz wurde auf dieselbe Weise behandelt, jedoch unter ausschließlicher Verwendung von Infektions-PBS. Nach einer Zentrifugation für 7 Min. bei 1 200 rpm und 4 °C wurden die Überstände verworfen, die Zellen eines jeden Ansatzes in 30 ml BA-RPMI-Inkubationsmedium aufgenommen und auf sechs 175-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen verteilt. Es wurden jeweils 5 ml Zellsuspension mit 45 ml BA-RPMI-Inkubationsmedium verdünnt. Hiernach erfolgte eine Inkubation für 11 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend wurde der Inhalt der Zellkulturflaschen in 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt und bei 1 200 rpm für 7 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abgekippt, die Zellpellets in 5 ml PBS resuspendiert und in einem weiteren 50-ml-Falcon-Röhrchen vereinigt. Anschließend wurden alle leer gewordenen Falcon-Röhrchen einmal im Kettenprinzip mit 5 ml PBS gespült, um Zellverluste möglichst gering zu halten. Die vereinigten Zellsuspensionen wurden dann für 7 Min. bei 4 °C und 5 % CO<sub>2</sub> zentrifugiert und zweimal mit 50 ml PBS gewaschen. Während den Zentrifugationszeiten wurde der zweifach konzentrierte CHAPS-Lysepuffer in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen angefertigt. Zu den Zellpellets der Ansätze wurde zusätzlich ein Volumen an zweifach konzentriertem und vier Volumen an einfach konzentriertem CHAPS-Lysepuffer gegeben. Es folgte eine einstündige Inkubation auf dem Schütteltisch bei 4 °C sowie eine viermalige 20 Sek. lange Beschallung der Zellen im Ultraschallbad. Danach wurde erneut für 1 Std. bei 4 °C auf dem Schütteltisch inkubiert sowie für 1 Std. bei 4 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Um Zelltrümmer



zu entfernen, wurde dann nur der Überstand weiterverwendet und dieser zusätzlich durch Verwendung eines 0,5-µm-Filters aufgereinigt.

#### 3.2.3.2.2 Vorbereitung nicht infizierter Zellen

Für die Immunaффinitätschromatographie der K562-DLA-88\*03201-, C1R-DLA-88\*03201- und C1R-HLA-A\*02:01-Zellen wurden diese zunächst ausgezählt und dann in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert (10 Min., 1 440 rpm, 4 °C). Nach dem Abkippen des Überstandes wurden die Zellpellets jeweils in 5 ml PBS resuspendiert und in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen vereinigt. Die Sorvall-Zentrifugationsgefäße wurden anschließend nach dem Kettenprinzip mit 5 ml PBS gespült und die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls in das 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Anschließend wurde erneut für 10 Min. bei 1 440 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und mit 30 ml PBS resuspendiert. Letztgenannter Waschschritt wurde insgesamt zweimal wiederholt, bevor das Zellpellet zur weiteren Verwendung bei –80 °C eingefroren wurde. Am Tag, an dem die Immunaффinitätschromatographie durchgeführt werden sollte, wurde das Zellpellet in der Hand aufgetaut und ein Volumen an zweifach konzentriertem CHAPS-Lysepuffer hinzugegeben. Anschließend wurde das Zelllysate in ein Pottergefäß überführt und die Zellen wurden durch langsames Auf- und Abbewegen des Pottergefäßes über 2 Min. bei 200 rpm zerkleinert. Das Zelllysate wurde in ein neues 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt, das Pottergefäß zweimal mit einfach konzentriertem CHAPS-Lysepuffer gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das 50-ml-Falcon-Röhrchen überführt. Im weiteren Verlauf wurde genauso vorgegangen, wie unter 3.2.3.2.1 beschrieben, nachdem der CHAPS-Lysepuffer hinzugegeben wurde.

#### 3.2.3.2.3 Vorbereitung der Säulenmatrix für die Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie konnten MHC-Komplexe aus den vorbereiteten Lysaten isoliert werden. Hierzu wurde der Antikörper BBM.1, der an Bromcyan-aktivierte Sepharose gekoppelt wurde, verwendet. Der Vorgang der Antikörperkopplung verlief in mehreren Schritten und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte jeweils für 4 Min. bei 300 rpm ohne Bremse. Als erstes wurden 40 mg Sepharose pro Milligramm verwendetem BBM.1-Antikörper in einem 50-ml-Falcon-Röhrchen eingewogen. Dann wurden zusätzlich 45 ml einer 1 mM Salzsäure hinzugegeben und nach fünfmaligem Schwenken für 30 Min. auf dem Drehrad rotiert. Anschließend wurde zentrifugiert und der

Überstand vorsichtig abgegossen. Dann wurde der Antikörper hinzugegeben und auf 45 ml mit Kopplungspuffer aufgefüllt. Nach fünfmaligem Schwenken wurde es für 2 Std. auf dem Drehrad rotiert und im Anschluss wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und anschließend das Falcon-Röhrchen mit 0,2 M Glycin auf 50 ml aufgefüllt. Es folgte ein fünfmaliges Schwenken und ein einstündiges Rotieren auf dem Drehrad. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und zweimal mit 45 ml PBS gewaschen. Abschließend wurde zentrifugiert und das Sediment anschließend in PBS resuspendiert, so dass 1 mg Antikörper pro Milliliter PBS vorlag. Die weitergehende Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### 3.2.3.2.4 Affinitätschromatographie

Vor der Verwendung der Chromatographie-Säulen mussten diese zunächst gewaschen werden. Hierzu wurden sie inklusive Deckel und Dreiwegehahn zweimal gegenläufig mit Ethanol und ddH<sub>2</sub>O gespült. Danach wurden die Säulen von außen abgetrocknet und mit beschriftetem Klebeband gekennzeichnet. Außerdem wurde überprüft, ob jede Säule einen Filter beinhaltete, so dass später die Zurückhaltung der Sepharosekügelchen im Inneren gewährleistet werden konnte.

Die Säulen wurden anschließend in den 4-°C-Kühlraum des S2-Labors überführt. Dort wurden sie zunächst an peristaltische Pumpen angeschlossen und mit Hilfe von Aufsaug- und Auslassschläuchen mit PBS gespült. Nachdem man die Säulen trockenlaufen ließ, wurde der Sepharose-gekoppelte Antikörper bei geschlossenem Dreiwegehahn in 1-ml-Teilmengen eingefüllt. Es wurde pro Milliliter Zellpellet 1 ml Antikörperlösung verwendet. Anschließend wurden die Säulensysteme mit einfach konzentriertem CHAPS-Lysepuffer gefüllt und das jeweilige Zelllysate aufgebracht. Diese ließ man mit einer Fließgeschwindigkeit von zwei Millilitern pro Minute über Nacht zirkulieren. Innerhalb der ersten halben Stunde kam der Kontrolle der Säulen eine besondere Bedeutung zu, da auf diese Weise undichte Stellen erkannt und somit ein Trockenlaufen verhindert werden konnte. Am nächsten Tag wurden die Säulen für 30 Min. mit PBS und für 1 Std. mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen.

#### 3.2.3.2.5 Elution und Ultrafiltration

Alle nachfolgenden Schritte wurden für den Infektionsansatz bei 4 °C im Kühlraum des S2-Labors oder im Falle der nicht infizierten Zellen im Kühlraum des S1-Labors durchgeführt unter Verwendung von niedrig bindenden Eppendorf-Reaktionsgefäßen sowie MS-reinen Pipettenspitzen. Zunächst wurden die 0,5-ml-Amicon-Filtereinheiten vorbereitet. Hierzu wurde jeweils nacheinander mit 500 µl LC-MS Wasser, 0,1 M NaOH, LC-MS Wasser und TFA-Lösung (0,2 %) für 10 Min. bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Währenddessen ließ man die Säulen trockenlaufen und bedeckte deren Matrix mit TFA-Lösung (0,2 %). Im ersten Schritt wurde zusätzlich 1 Tropfen 10%ige TFA-Lösung hinzugegeben, um den pH-Wert schneller abzusenken. Anschließend wurde für 30 Min. auf dem Schütteltisch inkubiert. Durch die saure Behandlung konnten Peptidliganden sowie nicht kovalent gebundene  $\alpha$ -Ketten und  $\beta_2$ -Mikroglobuline von den Säulen gelöst werden. Das Eluat wurde in der Folge mit einer 50-ml-Spritze aus den Säulen in die Amicon-Filtereinheiten geblasen. Die Zugabe von Trifluoressigsäure (0,2 %) wurde insgesamt achtmal durchgeführt. Die Ultrafiltration des Eluats erfolgte durch die Zentrifugation der Amicon-Filtereinheiten für jeweils 15 Min. bei 13 000 rpm. Dies wurde durchgeführt, bis das gesamte Eluat ultrafiltriert wurde. Abschließend wurde der Filter durch die Zugabe von 400 µl ABE gespült und der Durchlauf zu dem restlichen Ultrafiltrat gegeben. Mit Hilfe der Ultrafiltration konnten die Peptidliganden von den restlichen Bestandteilen der MHC-Komplexe separiert werden.

#### 3.2.3.2.6 Vakuumzentrifugation

Das Ultrafiltrat wurde anschließend mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 40 µl konzentriert. Hierbei konnte es passieren, dass die Proben aus organisatorischen Gründen eingetrocknet werden mussten. Um die Peptide anschließend wieder aus den Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu lösen, wurden 200 µl B\* hinzugegeben und die Proben zweimalig für 30 Sek. gevortext. Zwischen den beiden Vortexeinheiten wurde zusätzlich für 5 Min. im Ultraschallwasserbad inkubiert. Hinterher wurden 30 µl A\* ergänzt und abermals auf 40 µl Gesamtvolumen eingeengt.

### 3.2.3.2.7 Reinigung und Entsalzung

Im Anschluss konnten die Proben mit Hilfe von C18-Zip-Tip-Pipettenspitzen entsalzt, gereinigt und weiter aufbereitet werden. Hierzu wurden diese zunächst für 5 Min. bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend in ein niedrig bindendes 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden pro Probe zusätzlich vier niedrig bindende 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet. In zwei davon wurden jeweils A\* und B\* vorgelegt, während die Übrigen einmal als Beladungsgefäß und einmal als Abfall dienten. Außerdem wurde ein niedrig bindendes 0,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 20 µl B\* befüllt. Während der nachfolgenden Pipettierschritte musste darauf geachtet werden, dass keine Luft an das C18-Material gelangte. Hiervon ausgeschlossen war der letzte Elutionsschritt eines jeden Durchgangs. Insgesamt wurden fünf Durchgänge pro Probe durchgeführt. Verwendung fand hierbei eine 10-µl-Pipette, die auf ein Pipettivolumen von 10 µl eingestellt war. Der Reihe nach wurde wie folgt vorgegangen:

1. Reinigung der C18-Matrix: Aspiration und anschließendes Verwerfen von B\* (zehnmal).
2. Equilibrierung: Aspiration und anschließendes Verwerfen von A\* (fünfmal).
3. Beladung der C18-Matrix: Überführung der Probe in das Beladungsgefäß (Probe wird in den weiteren Durchgängen immer zwischen den zwei Reaktionsgefäßen hin- und herpipettiert).
4. Waschen und Entsalzen: Aspiration und anschließendes Verwerfen von A\* (dreimal).
5. Elution: 10-maliges Auf- und Abpipettieren in 20 µl B\* mit abschließendem Ausblasen des Pipetteninhalts.

Nach dem ersten Durchlauf wurden alle weiteren Durchläufe erst beim zweiten Schritt begonnen.

### 3.2.3.3 Massenspektrometrie

#### 3.2.3.3.1 Vorbereitung für die Massenspektrometrie

Das Eluat wurde in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 10 µl eingeeengt und in ein Autosampler-Vial überführt. Anschließend wurde mit A<sub>LOAD</sub> auf ein Gesamtvolumen von

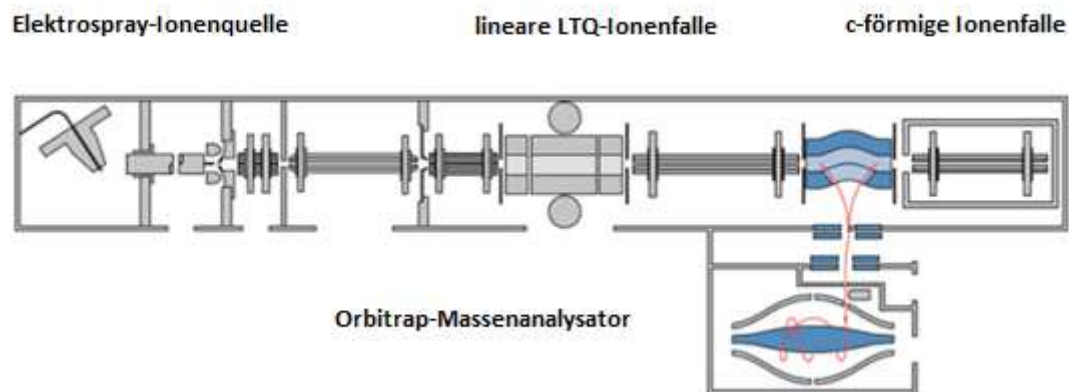
25 µl aufgefüllt und die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Messung bei –20 °C gelagert.

#### 3.2.3.3.2 LC-MS/MS

Zur Analyse und Detektion der isolierten Peptide wurde ein LC-MS/MS-System verwendet. Dieses ermöglicht die Trennung und Identifizierung von Molekülen durch die Kombination der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde mit einem 3000-RSLCnano-HPLC-System durchgeführt, das im Falle der C1R-Zellen an ein LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer und im Falle der JY-Zellen an ein Orbitrap-Fusion-Lumos-Massenspektrometer gekoppelt wurde. Die Nano-HPLC-Säule ermöglichte es, Peptide unter Einsatz einer steigenden Konzentration des unpolaren Lösungsmittels Acetonitril aufzutrennen [145]. Hierbei wurden pro Replikat jeweils 5 µl (20 %) des Zip-Tip-Eluats verwendet.

#### 3.2.3.3.3 LTQ Orbitrap XL

Zur massenspektrometrischen Analyse der Peptide von C1R-Zellen wurde ein LTQ-Orbitrap XL-Hybridmassenspektrometer verwendet. Dieses besteht aus fünf Hauptbestandteilen: einer Elektrospray-Ionenquelle, einer linearen LTQ-Ionenfalle, einer c-förmigen Ionenfalle, einer Kollisionszelle sowie einem Orbitrap-Massenanalysator (Abbildung 14). Nach Auftrennung der Peptide mittels HPLC-Verfahren wurden diese mittels Electrospray-Ionisation (ESI) ionisiert. Bei der ESI werden die Moleküle mit Hilfe eines Lösungsmittels durch eine Kapillare geleitet, an der ein hohes elektrisches Potential herrscht. In der Folge werden die Moleküle durch das große elektrische Feld beim Austritt in kleinen geladenen Lösungsmitteltröpfchen versprüht.



**Abbildung 14:** Darstellung eines LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometers.

Veranschaulicht wird die Elektrospray-Ionenquelle mit anschließender linearer LTQ-Ionenfalle. Im Anschluss daran befindet sich die c-förmige Ionenfalle sowie der Orbitrap-Massenanalysator zur Bestimmung des  $m/z$ -Verhältnisses. (Quelle: [146], modifiziert durch C. Schreitmüller).

Diese verlieren anschließend immer weiter an Volumen, was durch das Verdampfen ihres Lösungsmittels sowie den fortschreitenden Zerfall in kleinere Tröpfchen (Coulomb-Explosion) bedingt ist [147].

Bezüglich der finalen Bildung einzelner Analytionen bestehen derzeit zwei Theorien: zum einen die Theorie des geladenen Rückstands (*charged residue model*, CRM), bei der letztendlich durch die fortwährende Verdampfung des Lösungsmittels und weitere Coulomb-Explosionen einzelne Ionen übrig bleiben [148], zum anderen das Ionenemissionsmodell (*ion emission model*, IEM), bei dem von einer direkten Ionenfreisetzung aus hochgeladenen Tröpfchen, die mehrere Ionen enthalten, ausgegangen wird [149]. Die so generierten Ionen werden dann in die lineare LTQ-Ionenfalle weitergeleitet und anschließend portionsweise zur Speicherung und Lagerung in eine c-förmige Ionenfalle überführt. Von dort aus erfolgt der allmähliche Transfer der Ionen in den Orbitrap-Analysator. Dieser besteht aus einer zentralen, spindelförmigen Elektrode sowie zwei äußeren, glockenförmigen Elektroden. Innerhalb des Orbitrap-Analysators beginnen die Ionen durch elektrostatische Anziehungskraft um die zentrale Elektrode zu rotieren. Dabei schwingen sie je nach Masse-zu-Ladung-Verhältnis in unterschiedlicher Frequenz entlang der z-Achse der Elektrode. Die Frequenz dieser Oszillation kann von einem Detektor registriert und in ein Massenspektrum konvertiert werden [150, 151].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst Übersichtsscans (MS1-Scans) der Vorläuferionen in dem Orbitrap-Massenanalysator angefertigt. Anschließend wurden die fünf häufigsten Vorläuferionen ausgewählt, in der linearen LTQ-Ionenfalle mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) fragmentiert und deren Fragmentationen aufgezeichnet.

#### 3.2.3.3.4 Orbitrap Fusion Lumos

Für die Analyse viraler und zellulärer Peptide von Influenza-infizierten JY-Zellen wurde ein Orbitrap-Fusion-Lumos-Massenspektrometer verwendet. Dieses besitzt, im Vergleich zu dem für die anderen Zelltypen verwendeten LTQ-Orbitrap-XL-Hybridmassenspektrometer, eine höhere Sensitivität und eine höhere Auswertungsgeschwindigkeit. Somit konnte gewährleistet werden, dass, trotz einer nur einmalig durchgeführten Immunoaffinitätschromatographie, eine ausreichende Anzahl an Peptidsequenzen detektiert werden konnte.

#### 3.2.3.3.5 Peptididentifizierung

Die Peptide wurden zunächst unter Verwendung einer Nano-HPLC-Säule aufgetrennt. Anschließend wurden die Vorläuferionen innerhalb einer Spanne von 400 bis 650 Th bei einer Auflösung von 60 000 aufgezeichnet. Bei den K562- und C1R-Transfektanten wurden jeweils die fünf häufigsten zwei- und dreifach geladenen Vorläuferionen von jedem MS1-Scan für eine CID ausgewählt und für 3 Sek. von der wiederholten Fragmentierung ausgeschlossen. Bei den JY-Zellen wurde jeweils eine Hochgeschwindigkeitsmethode angewendet, bei der mit einer dynamischen Ausschlusszeit von 7 Sek. so viele Ionen wie möglich fragmentiert wurden. Die Fragmentationen wurden entweder in der LTQ-Ionenfalle aufgezeichnet (K562- und C1R-Transfektanten) oder mit einer Auflösung von 30 000 im Orbitrap-Massenanalysator (JY-Zellen). Die MS-Daten wurden mit Hilfe des Programms Proteome Discoverer 1.4. analysiert. Hierbei wurde die Suchmaschine Mascot 2.2.04 für die nicht infizierten Zellen und die Suchmaschine Sequest für die Infektionsansätze verwendet. Die Annotation der Fragmentspektren erfolgte mit den 20 279 geprüften (*reviewed*) humanen Proteinen der Datenbank Swiss-Prot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org), Stand: 27. September 2013). Für die Infektionsansätze war die humane Datenbank zusätzlich um Aminosäuresequenzen des Influenzavirus A/Regensburg/D6/2009 (H1N1) ergänzt worden. Hierfür wurden die Nukleotidsequenzen der NCBI-Nukleotiddatenbank verwendet und in alle drei Leseraster mittels des Übersetzungsprogramms ExPASy [152] übersetzt. Die umgekehrten Formen der Proteine

der Zieldatenbank bildeten eine getrennte Köderdatenbank. Weitergehend wurden folgende Filterkriterien verwendet (Tabelle 13):

**Tabelle 13: Verwendete Filterkriterien zur Peptididentifizierung**

	JY	C1R-DLA-88*50101	C1R-HLA-A*02:01	K562-DLA-88*03201	C1R-DLA-88*03201
<b>erlaubte Massenabweichung</b>	MS1: 5 ppm MS2: 0,02 Da	MS1: 5 ppm MS2: 0,5 Da			
<b>Peptidlänge</b>	8–12 Aminosäuren				
<b>False discovery rate</b>	5 %				
<b>variable Modifikationen</b>	Oxidation von Methion (+15,99492 Da) Cysteinylierung von Cystein (+119,00410 Da)		Oxidation von Methion (+15,99492 Da)		

### 3.2.3.3.6 HLA-Annotation

Zur Charakterisierung des Bindemotives für DLA-88\*03201 sowie zur Bestimmung der viralen und zellulären Peptide, die von DLA-88\*50101 präsentiert werden, sollten HLA-Liganden, die von den endogen exprimierten humanen MHC-Komplexen stammten, nicht miteinbezogen werden. Ebenso durften bei der Ermittlung der viralen Peptide, die vom HLA-A\*02:01 der JY-Zellen präsentiert wurden, die B\*07:02- und C\*07:02-restringierten Peptide nicht berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden bei den C1R-Zellen die natürlich präsentierten HLA-B\*35:03- und HLA-C\*04:01-restringierten Peptide und bei den JY-Zellen die B\*07:02- und C\*07:02-restringierten Peptide von der jeweils gefundenen Gesamtpeptidzahl pro Experiment subtrahiert. Die dafür notwendige Zuordnung der identifizierten Aminosäuresequenzen zu den jeweiligen HLA-Allelen erfolgte mittels SYFPEITHI [31] und netMHC-3.4 [153]. SYFPEITHI beinhaltet über 7 000 Peptidsequenzen und basiert auf experimentell gewonnenen Daten von T-Zell-Epitopen und MHC-Liganden, wobei die Übereinstimmung eines Peptids mit dem Bindemotiv eines Allotyps bewertet wird. Das Softwareprogramm netMHC-3.4 berechnet die theoretische Affinität eines Peptids mit einem HLA-Allotyp mittels artifizierlicher neuronaler Netzwerke. Die Peptide mussten zur Bestimmung der jeweiligen HLA-Restriktion für SYFPEITHI jeweils mehr als 50 % des Allotyp-spezifischen Maximalwertes aufweisen, für netMHC 3.4 galt jeweils eine mittlere inhibitorische Konzentration kleiner als 500 Nanomolar.



#### 3.2.3.3.7 Bestimmung der Bindungsaffinität

Für die identifizierten viralen Peptide wurde jeweils die Bindungsaffinität an HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 mittels des Programms SYFPEITHI@home und des Servers NetMHCpan 3.0 bestimmt. SYFPEITHI@home beruht hierbei auf experimentell gewonnenen Daten von MHC-Liganden, mit deren Hilfe HLA-A\*02:01- und DLA-88\*50101-spezifische Matrizen gebildet wurden. Die Matrizen gaben dabei Aufschluss über die Häufigkeitsverteilung der Aminosäuren an einer bestimmten Position und somit über die spezifischen Ankerpositionen eines jeden Allels. Der Grad der Assoziation einer Peptidsequenz mit dem HLA-A\*02:01- oder DLA-88\*50101-Bindemotiv wurde jeweils als Score angegeben. Dieser war umso höher, je größer die Übereinstimmung eines Peptides mit einem Bindemotiv war. Mit NetMHCpan 3.0 wurde jeweils die Interaktion eines Peptides mit einem HLA-Allotyp beurteilt und als %-Rank angegeben. Der %-Rank (prozentuale Rangstufe) war hierbei umso kleiner, je größer die Bindungsaffinität war.

#### 3.2.3.3.8 Gibbs-Clustering

Zur Analyse der identifizierten Peptide einer Länge des ersten und zweiten Experiments mit transfizierten C1R-DLA-88\*03201-Zellen war der Server GibbsCluster-2.0 der technischen Universität in Dänemark verwendet worden. Dieser ermöglicht den gleichzeitigen Abgleich und die Gruppierung von Peptiden anhand der Untersuchung von Gemeinsamkeiten in ihrer Sequenz unter Verwendung eines spezifischen Gibbs-Clustering-Algorithmus. Weitergehend können dann Bindemotive innerhalb eines bestimmten Peptidsequenzdatensatzes aufgeschlüsselt und somit kann eine Aussage über die mögliche Zuordnung der Peptide zu bestimmten MHC-Bindemotiven gemacht werden. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber anderen ist, dass hierbei mögliche Kontaminanten detektiert und ausgeschlossen werden können [154, 155]. Da die verwendeten C1R-Zellen auch im natürlichen Zustand über eine eigene Expression von HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01 verfügen [156-158] und die Bindemotive beider MHC-Allele bereits bestimmt wurden, konnte durch den Abgleich der konstruierten Bindemotive mit den publizierten Ankeramino-säuren eine Zuordnung der Peptide aus dem Peptidpool der beiden Experimente durchgeführt und sich zusätzlich ein Bild der DLA-Expression gemacht werden. Für die Analysen wurde ein Schwellenwert von null für die Aus-sortierung von Peptiden verwendet und die Anzahl an zu detektierenden Gruppen wurde auf drei begrenzt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Teil 1: Bestimmung der Bindspezifitäten für das Allel DLA-88\*03201

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war die Bestimmung der Bindspezifitäten für das canine MHC-Klasse-I-Allel DLA-88\*03201. Hierfür wurden C1R-Zellen sowie K562-Zellen mittels verschiedener Methoden mit DLA-88\*03201 transfiziert. Durch die Verwendung eines sogenannten Selektionsmarkers, einem Geneticin-Neomycin-Resistenzgen, das ebenfalls bei der Transfektion in die Zielzellen eingebracht wurde und für die Ausbildung von Aminoglykosid-Phosphotransferasen kodiert, konnte durch die Zugabe des Antibiotikums G418 auf Zellen selektiert werden, bei denen eine erfolgreiche Transfektion stattgefunden hatte. Diese Zellen wurden durch den Einsatz von Limiting Dilutions verdünnt, wodurch Klone mit hoher DLA-Expression vereinzelt wurden. Die Analyse der Klone und Bestimmung von deren DLA-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Nur Klone mit einer hohen DLA-Expression wurden weiter kultiviert, da nur diese eine reiche Ausbeute an MHC-Peptiden versprachen. Anschließend wurden Peptide von den MHC-Komplexen dieser Klone gelöst und mittels Immunaффinitätschromatographie isoliert. Nach massenspektrometrischer Analyse konnten die verschiedenen Peptidsequenzen schließlich miteinander verglichen werden und durch die Häufigkeit des Auftretens einzelner Aminosäure an bestimmten Stellen konnte ein mögliches Bindemotiv bestimmt werden.

#### 4.1.1 Transfektion und Bestimmung der DLA-Expression

Zur Charakterisierung des caninen MHC-Klasse-I-Bindemotives von DLA-88\*03201 wurden humane C1R- und K562-Zellen mit dem Allel DLA-88\*03201 transfiziert. Das Transgen kodierte hierbei für die Ausbildung der schweren Kette des MHC-Klasse-I-Moleküls, wohingegen die leichte Kette, das  $\beta_2m$ , durch die humanen Zellen gestellt wurde.

#### 4.1.1.1 C1R-Zellen mit DLA-88\*03201

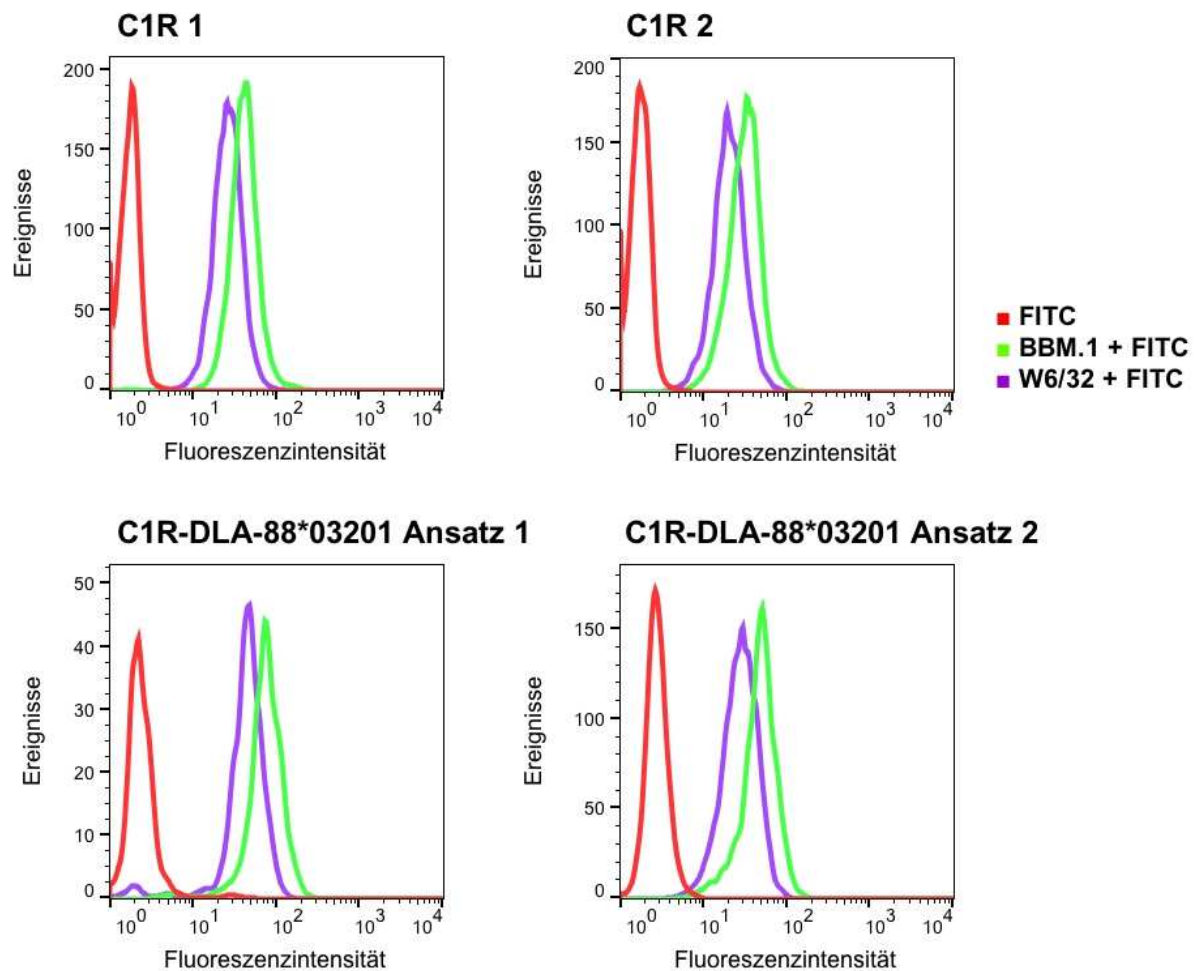
##### *Transfektion mittels Lipofectamine3000- und ScreenFectA-Transfektionskit*

Zwei Tage nach Zugabe des RPMI-Selektivmediums mit dem Antibiotikum G418 zeigten die transfizierten C1R-Zellen in beiden Fällen bei lichtmikroskopischer Analyse eine zunehmende Granulation, die schließlich nach circa 1,5 Wochen in eine komplette Verwandlung der Zellen in Zelltrümmer mündete. Auf diesen Beobachtungen basierte die Annahme, dass der Transfektionserfolg bei beiden Methoden ausgeblieben war. Die Zellen beider Ansätze wurden somit verworfen.

##### *Transfektion mittels Elektroporation*

Einen Tag, nachdem die Zellen unter Verwendung der Elektroporation transfiziert worden waren, erfolgte der Austausch des RPMI-Zellkulturmediums durch ein RPMI-Selektivmedium mit dem Antibiotikum G418. Nach circa 1,5 Wochen erfolgte eine lichtmikroskopische Untersuchung der Zellen. Hierbei konnten größtenteils intakte Zellen und nur vereinzelt Zelltrümmer festgestellt werden. Diese Beobachtungen ließen die Annahme zu, dass die Transfektion in diesem Fall mittels Elektroporation funktioniert hatte. In der Folge wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, um den Transfektionserfolg zu bestätigen und dessen Grad zu bestimmen (Abbildung 15). Hierfür wurden einerseits transfizierte C1R-DLA-88\*03201-Zellen von zwei verschiedenen Elektroporationsansätzen sowie andererseits nicht transfizierte C1R-Zellen als Negativkontrolle verwendet. Zur Bestimmung der MHC-Expression wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert. Es wurde als Primärantikörper entweder der Antikörper BBM.1, der spezifisch an das humane  $\beta$ 2-Mikroglobulin bindet, oder aber der Antikörper W6/32, der spezifisch für HLA-A, -B und -C ist, verwendet. Als Sekundärantikörper kam ein FITC-markierter Antikörper zum Einsatz. Die Verwendung des BBM.1-Antikörpers ermöglichte die gleichzeitige Detektion von humanen sowie caninen MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche. Die Expression von humanen MHC-Molekülen auf der Oberfläche von C1R-Zellen war zu erwarten, da diese bekanntermaßen über eine eigene HLA-B\*35:03- und C\*04:01-Expression verfügen. Die Möglichkeit, canine MHC-Moleküle mit Hilfe des BBM.1-Antikörpers zu detektieren, ergibt sich dadurch, dass das transfizierte DLA-Gen jeweils nur für die schwere Kette des caninen MHC-Moleküls kodiert, welche wiederum ein Hybrid-MHC-Molekül mit dem huma-

dem  $\beta$ 2-Mikroglobulin der Zelle bildet, das mit BBM.1 erkannt werden kann. Durch die Berücksichtigung der Fluoreszenzkurven von BBM.1 und W6/32 kann somit die Fluoreszenzintensität von DLA-Molekülen und der im natürlichen Zustand exprimierten HLA-Molekülen dargestellt werden.



**Abbildung 15: Histogramme der mittels Elektroporation transfizierten C1R-DLA-88\*03201-Zellen.**

Die rote Kurve stellt die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers dar. Die lila Kurve zeigt die Fluoreszenz der Ansätze, die mit W6/32-Antikörper behandelt worden waren, die grüne Kurve die Fluoreszenz der Ansätze, die mit BBM.1-Antikörper inkubiert worden waren.

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACSCalibur-Zytometer unter Verwendung des Programms CellQuestPro und nachfolgender Visualisierung mittels FlowJo Version 10.0.7.

In Abbildung 15 werden die Histogramme der mittels Elektroporation transfizierten C1R-DLA-88\*03201-Zellen sowie von nicht transfizierten C1R-Zellen dargestellt. Hierbei ist auf der y-Achse der Histogramme die Anzahl der gezählten Ereignisse aufgetragen, wohingegen die x-Achse die jeweils zugehörigen Fluoreszenzintensitäten als dekadischen Logarithmus angibt. Bei der Auswertung wurde jeweils zusätzlich der Median zu jeder Fluoreszenzkurve bestimmt (Tabelle 14). Bei Betrachtung der Histogramme aus Abbildung 15 wird zunächst ersichtlich, dass sich die Fluoreszenzkurven des FITC-Antikörpers für alle Proben wie gewünscht im niedrigen Fluoreszenzbereich befanden. Daraus ergab sich, dass der Grad der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers für jede Probe niedrig war. Dies stimmte mit den berechneten Medianen der FITC-Antikörper-Fluoreszenz überein, wobei die Mediane der transfizierten Zellen jeweils eine etwas höhere Fluoreszenz in diesem Bereich vorzuweisen hatten. Die Mediane der Fluoreszenzintensität für den Antikörper W6/32 lagen für die Negativkontrollen und den ersten Transfektionsansatz im Bereich zwischen 25,89 und 27,88, wohingegen der Median des zweiten Transfektionsansatzes 45,01 betrug (siehe Tabelle 14).

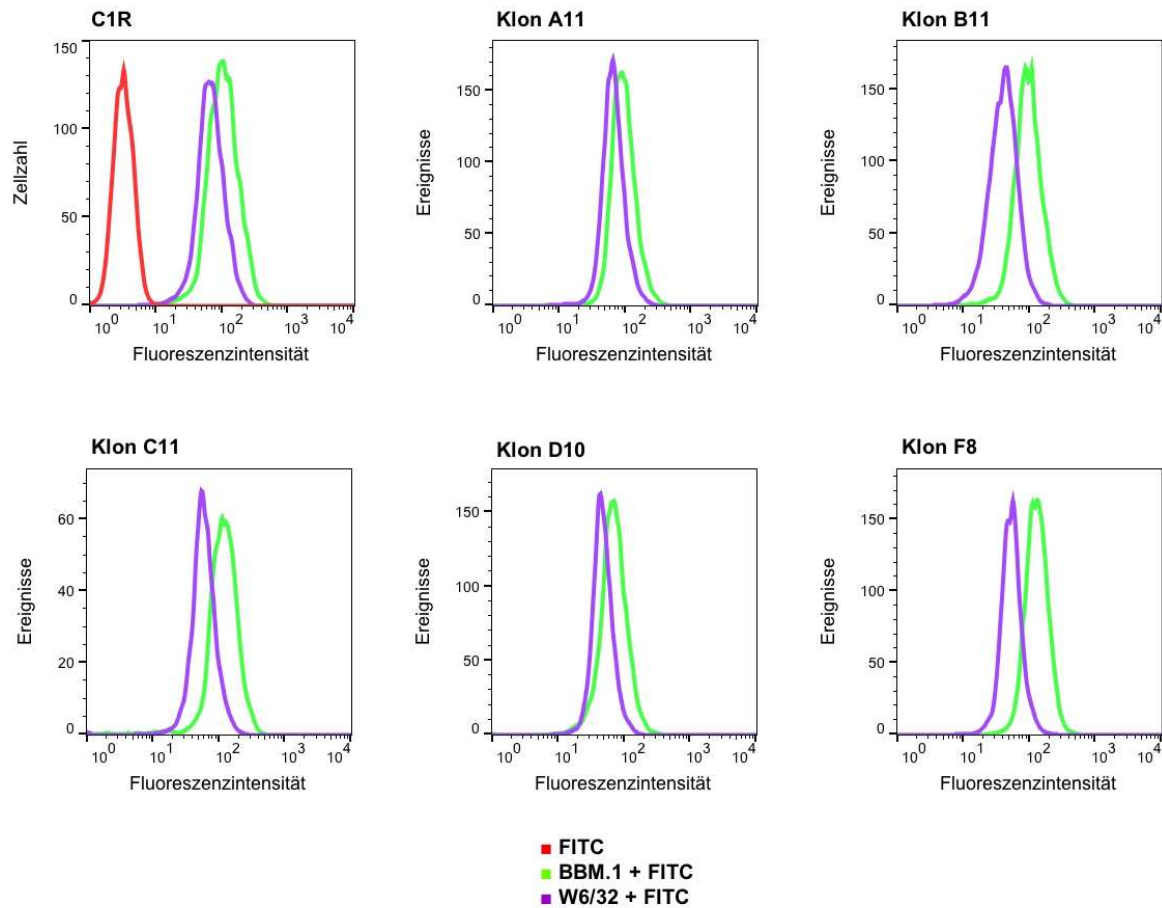
**Tabelle 14: Mediane der mittels Elektroporation transfizierten C1R-DLA-88\*03201-Zellen.**

Probe	C1R 1	C1R 2	C1R-DLA-88*03201 Ansatz 1	C1R-DLA-88*03201 Ansatz 2
<b>Median unspezifische Bindung Sekundär-AK</b>	1,76	1,75	2,73	2,28
<b>Median Fluoreszenz W6/32</b>	25,89	20,12	27,88	45,01
<b>Median Fluoreszenz BBM.1</b>	40,68	31,55	48,04	74,15
<b>Differenz: Median BBM.1 – Median W6/32</b>	14,79	11,43	20,16	29,14

Die Mediane der Fluoreszenzintensität für den Antikörper BBM.1 lagen für die Negativkontrollen bei 40,68 und 31,55, für den ersten Transfektionsansatz bei 20,16 und für den zweiten Transfektionsansatz deutlich höher, nämlich bei 74,15. Die Werte der berechneten Mediane entsprachen somit dem Bild, das bereits die Histogramme zeigten. Um die Fluoreszenzintensität, die von DLA-Molekülen ausging, abschätzen zu können, wurde jeweils die Differenz der Mediane aus der BBM.1- und der W6/32-Fluoreszenz für jede Probe gebildet. Hierbei zeigten der erste und der zweite Transfektionsansatz jeweils eine höhere Differenz als die beiden Negativkontrollen. Somit wurde angenommen, dass diese durchflusszytometrischen Ergebnisse den Transfektionserfolg der Zellen bestätigten, da die vergleichsweise hohen Differenzen der Mediane beider Primärantikörper der Elektroporationsansätze, gegenüber den Negativkontrollen, als Ursache der zusätzlichen DLA-Expression gesehen wurden. In der Folge wurden die Zellen des zweiten Transfektionsansatzes mittels der Methode der Limiting Dilution weiterverdünnt, um einen Klon mit möglichst hoher DLA-Expression zu selektieren.

#### *Limiting Dilution*

Die Zellen des zweiten Elektroporationsansatzes wurden mit der Methode der Limiting Dilution verdünnt und die DLA-Expression der Klone hoher Verdünnungsstufen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellen des Klons, der die höchste DLA-Expression aufwies, wurden dann für eine weitere Limiting Dilution verwendet. Insgesamt wurden die vorangegangenen Schritte dreimal wiederholt, bis ein Klon mit einer ausreichend hohen DLA-Expression für eine nachfolgende Immunaффinitätschromatographie selektiert werden konnte. In Abbildung 16 sind die Histogramme verschiedener Klone der dritten durchflusszytometrischen Analyse nach vorausgegangener Selektion mittels Limiting Dilution dargestellt. Als Negativkontrolle wurden nicht transfizierte C1R-Zellen verwendet. Zur Bestimmung der HLA-Expression wurde ebenfalls wie zur durchflusszytometrischen Bestätigung des Transfektionserfolgs (4.1.1.1.) der Antikörper W6/32, der nur spezifisch für HLA-A, -B und -C ist und somit nicht an die caninen MHC-Moleküle bindet, verwendet. Um die Expression an DLA-Molekülen abschätzen zu können, wurde genauso mit dem Antikörper BBM.1 inkubiert, der an alle MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Klone bindet.



**Abbildung 16: Histogramme der C1R-DLA-88\*03201-Klone der dritten Limiting Dilution.**

Die rote Kurve stellt die unspezifische Bindung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers dar, die lila Kurve zeigt die Fluoreszenzintensität der Proben, die mit dem Antikörper W6/32, die grüne Kurve die Fluoreszenzintensität der Proben, die mit dem Antikörper BBM.1 inkubiert worden waren.

Für alle Proben wurde zusätzlich der Median der Fluoreszenzintensitäten bestimmt (Tabelle 15). Bei Betrachtung der Fluoreszenzkurven für den W6/32- und den BBM.1-Antikörper der Negativkontrolle in Abbildung 16 fiel zunächst auf, dass sich beide beinahe überschneiden. Dies war zu erwarten, da die Zellen in diesem Fall nur HLA-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, an die die Primärantikörper binden können. Verglich man des Weiteren die Kurvenverläufe der Negativkontrolle mit denen der transfizierten Klone, zeigten die Klone A11 und D10 einen relativ ähnlichen Kurvenverlauf für die Antikörper BBM.1 und W6/32. Somit ist bei diesen Klonen von keiner oder nur einer geringen DLA-Expression auszugehen. Diese Annahme wurde durch die Bestimmung der Mediane der Klone bestätigt (Tabelle 15).



Tabelle 15: Mediane der C1R-DLA-88\*03201-Klone der dritten Limiting Dilution.

Probe	C1R	Klon A11	Klon B11	Klon C11	Klon D10	Klon F8
<b>Median unspezifische Bindung Sekundär-AK</b>	3,23	-	-	-	-	-
<b>Median Fluoreszenz W6/32</b>	66,41	64,94	40,86	57,77	46,24	53,16
<b>Median Fluoreszenz BBM.1</b>	102,04	91,19	94,32	116,78	68,54	127,20
<b>Differenz: Median BBM.1 – Median W6/32</b>	35,63	26,25	53,46	59,01	22,30	74,04

Bildete man hierbei die Differenz der Mediane beider Primärantikörper, erzielte man sogar noch einen kleineren Wert für die beiden Klone als für die Negativkontrolle. Die Klone B11, C11 und F8 zeigten hingegen bei visueller Begutachtung der zugehörigen Histogramme eine relativ starke Abweichung zwischen der Fluoreszenzintensitätskurve des BBM.1- und des W6/32-Antikörpers. Dieser Eindruck bestätigte sich auch, wenn man die zugehörigen Differenzen der Mediane der einzelnen Proben betrachtete. Für alle drei Klone war die Differenz deutlich größer als bei der Negativkontrolle, jedoch hob sich der Klon F8 besonders ab, da bei ihm die Differenz mit 74,04 mehr als doppelt so hoch wie bei der Negativkontrolle war. Die vergleichsweise hohen Differenzen der Mediane beider Primärantikörper gegenüber den Negativkontrollen wurden als Ursache der zusätzlichen Bindung des BBM.1-Antikörpers an canine MHC-Moleküle neben den natürlich exprimierten humanen MHC-Molekülen gesehen. In der Folge wurde der Klon F8 auf Grund seiner relativ hohen DLA-Expression zur Immunaffinitätschromatographie herangezogen.

#### 4.1.1.2 K562-Zellen mit DLA-88\*03201

##### *Transfektion mittels Lipofectamine®3000-Transfektionskit*

Die transfizierten Zellen zeigten 4 Tage nach Zugabe des Antibiotikums G418 eine vermehrte intrazelluläre Granulation bei lichtmikroskopischer Analyse. Nach 1,5 Wochen konnten schließlich nur noch Zelltrümmer und keine überlebenden Zellen im Medium ausgemacht werden. Als Schlussfolgerung wurde angenommen, dass die Verwendung des Lipofectamine3000-Transfektionskits zu keiner erfolgreichen Transfektion der K562-Zellen geführt hatte.

##### *Transfektion mittels ScreenFectA-Transfektionskit*

Zur Transfektion der K562-Zellen wurden unterschiedliche Mengen an ScreenFectA-Reagenz während der Inkubation verwendet. Es fand jeweils ein Ansatz mit 0,2, einer mit 0,3 und einer mit 0,4 µl ScreenFectA-Reagenz Verwendung, wodurch herausgefunden werden sollte, wie viel Transfektionsreagenz idealerweise für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen benötigt wird. Eine erste lichtmikroskopische Begutachtung der Zellen erfolgte 4 Tage nach der Transfektion. Hierbei konnte bei den Zellen, die mit 0,2 und 0,3 µl Reagenz inkubiert worden waren, eine verstärkte Granulation beobachtet werden. Die Zellen des Ansatzes mit 0,4 µl Reagenz hingegen zeigten nur teilweise eine vermehrte Granulation und wurden in der Folge in eine 48-Well-Platte überführt. Durch mehrmaliges Splitten und Umsetzen der Zellen des letzten Ansatzes konnten daraufhin ausschließlich Zellen selektiert werden, denen das G418-Antibiotikum nichts „anhaben“ konnte. Es wurde somit angenommen, dass die Transfektion bei diesen Zellen erfolgreich war, da mit dem Antibiotikaresistenzgen auch der DLA-88\*03201-Genabschnitt eingebracht worden war. Die Zellen der zwei anderen Ansätze zeigten keine Antibiotikaresistenz und somit auch keinen Transfektionserfolg.

##### *Limiting Dilution*

Die Zellen, die mit 0,4 µl ScreenFectA-Reagenz transfiziert worden waren, wurden zur Selektion auf Transfektanten mit einer möglichst hohen DLA-Expression mittels der Methode der Limiting Dilution verdünnt und rekloniert. Anschließend wurden die Klone zur Überprüfung der DLA-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde im Vergleich zur Analyse der transfizierten C1R-Zellen ausschließlich BBM.1 als Primärantikörper verwendet, da die K562-Zellen über keine eigene humane MHC-Expression verfügten und der Antikörper spezi-

fisch für das  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist, das von der humanen Zelle gestellt wird und einen Hybridkomplex mit der schweren  $\alpha$ -Kette bildet, für die das DLA-88\*03201-Gen kodiert. Als Sekundärantikörper wurde ein fluoreszenzmarkierter Antikörper verwendet. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an einem FACSCalibur-Zytometer unter Verwendung des Programms CellQuestPro und nachfolgender Visualisierung mittels FlowJo Version 10.0.7. Die Histogramme der reklonierten K562-DLA-88\*03201-Zellen sind in Abbildung 17 dargestellt. Die rote Kurve zeigt die unspezifische Bindung des FITC-Sekundärantikörpers, die orange Kurve die unspezifische Bindung des BBM.1-Primärantikörpers und die grüne Kurve die Fluoreszenzintensität der Klone nach Inkubation mit BBM.1. Als Referenz zur Bestimmung der DLA-Expression der Klone diente die Fluoreszenzintensität nicht transfizierter K562-Zellen. Diese zeigten für BBM.1- und FITC-Sekundärantikörper jeweils Fluoreszenzintensitätspeaks im unteren Fluoreszenzbereich, weshalb von einer niedrigen unspezifischen Bindung beider Antikörper an K562-Zellen auszugehen war. Klone, die nur mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper markiert worden waren, zeigten ebenfalls eine niedrige Fluoreszenz (wie bei der Negativkontrolle). Alle Klone der transfizierten K562-DLA-88\*03201-Zellen zeigten nach Inkubation mit dem Antikörper BBM.1 einen Fluoreszenzintensitätspeak mit einer Fluoreszenz unter  $10^1$ , mit Ausnahme der Klone E8 und F7, bei denen die Fluoreszenz bei  $10^1$  und  $3 \times 10^1$  lag. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der Klone oberhalb einer Fluoreszenzintensität von  $10^2$  zeigten die Klone B10, E8 und F7, im Vergleich zu den anderen Klonen, eine relativ hohe Fluoreszenzintensität. Aus diesem Grund wurden diese Klone daraufhin jeweils mittels einer weiteren Limiting Dilution verdünnt und die DLA-Expression der Subklone anschließend erneut durch durchflusszytometrischen Analysen bestimmt.

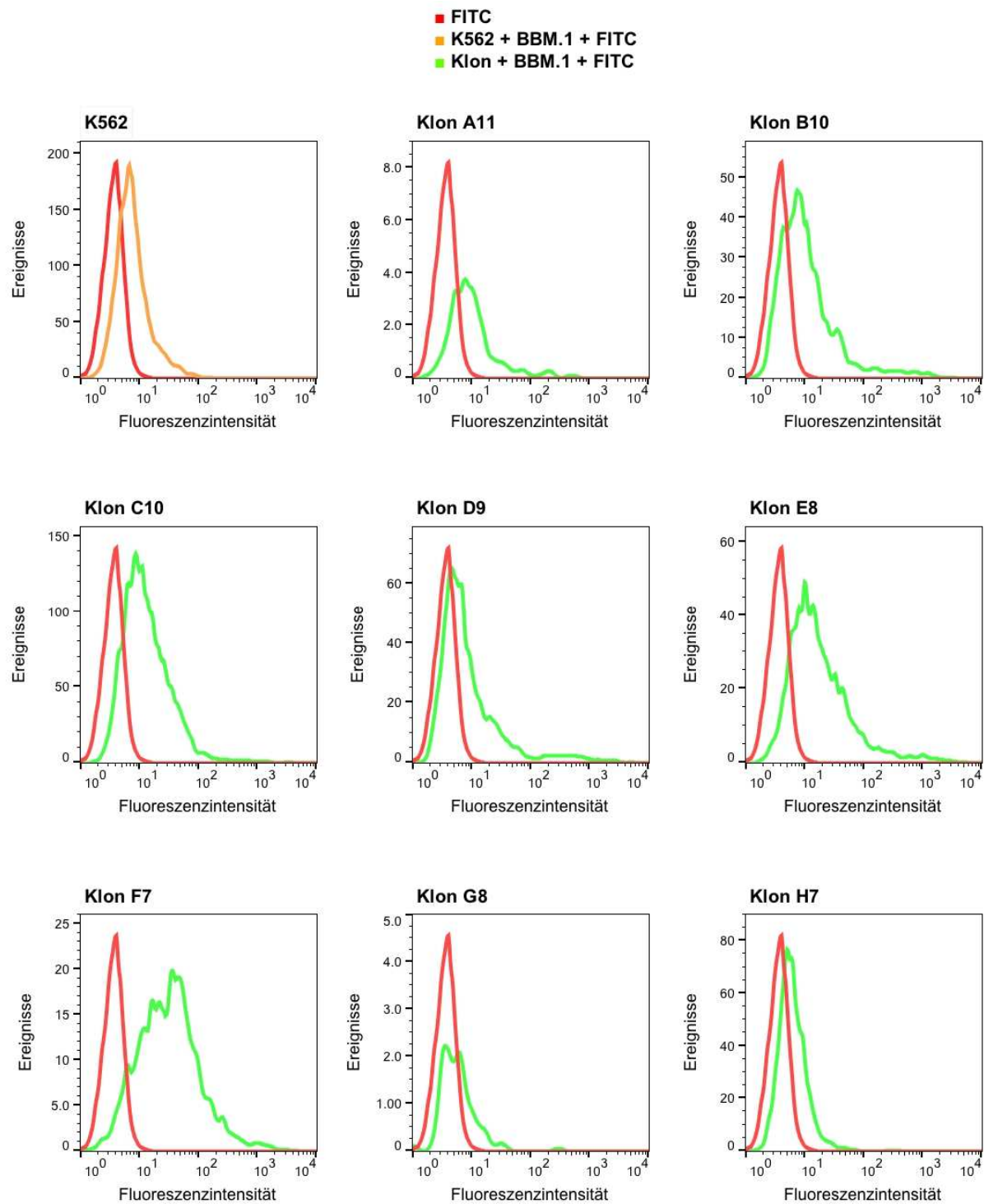
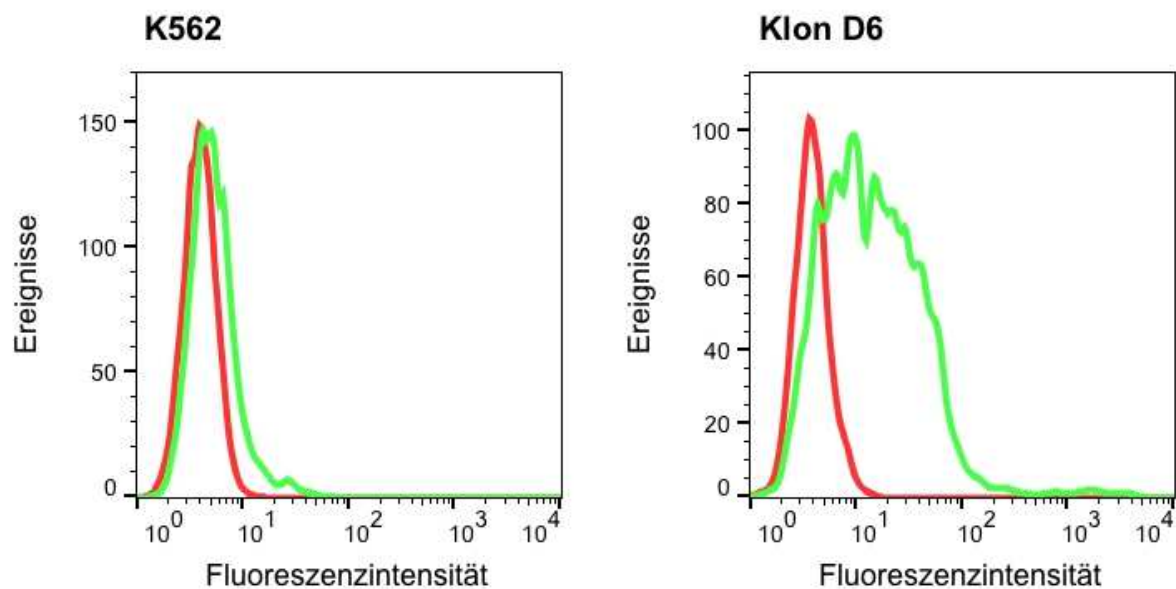


Abbildung 17: Histogramme der mit DLA-88\*03201 transfizierten K562-Zellen.

Die rote Kurve stellt die unspezifische Bindung des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers dar. Die grüne und die orange Kurve zeigen die Fluoreszenzintensität der Proben nach Inkubation mit dem Primärantikörper BBM.1

Der Subklon, der eine besonders hohe DLA-Expression aufwies, wurde anschließend aufeinanderfolgend mit BBM.1- und FITC-Antikörper behandelt und eine Selektion stark exprimierender Zellen am BD-FACS-Jazz-Zellsorter vorgenommen. Anschließend wurden die selektierten Zellen erneut mittels Limiting Dilution rekloniert und durchflusszytometrisch bestimmt. Abbildung 18 zeigt das Histogramm eines Klons, der auf Grund seiner DLA-Expression für eine nachfolgende Immunaффinitätschromatographie herausgesucht wurde. Zur Bestimmung der DLA-Expression ist der gleiche Antikörper verwendet worden, wie vorangehend beschrieben wurde. Die BBM.1-Fluoreszenzintensitätskurve des Klons D6 zeigt im Vergleich mit nicht transfizierten K562-Zellen eine deutlich höhere Fluoreszenz. Dies spiegelt sich ebenfalls in den Medianen der Kurven wieder (Tabelle 16).



**Abbildung 18:** Histogramm des K562-DLA-88\*03201-Klons D6, der auf Grund seiner DLA-Expression zur Immunaффinitätschromatographie weiterverwendet wurde. Die rote Kurve stellt die unspezifische Bindung des FITC-Sekundärantikörpers dar. Die grüne Kurve zeigt die Fluoreszenz der Proben nach Inkubation mit dem Antikörper BBM.1

Während der BBM.1-Antikörper bei den nicht transfizierten Zellen eine geringe unspezifische Bindung aufweist und somit einen niedrigen Median der Fluoreszenzkurve, befindet sich der Median der Fluoreszenzkurve des Klons D6 der K562-DLA-88\*02301-Zellen hingegen in einem deutlich höheren Fluoreszenzbereich.

**Tabelle 16: Median des K562-DLA-88\*03201-Klons D6, der zur Immunaффinitätschromatographie selektiert wurde.**

Probe	K562	Klon D6
Median unspezifische Bindung Sekundär-AK	3,94	3,79
Median Fluoreszenz BBM.1	5,05	13,31

#### 4.1.2 Immunaффinitätschromatographie

Um eine große Peptidausbeute bei der Immunaффinitätschromatographie zu gewährleisten, wurden transfizierte Zellen mit einer möglichst hohen MHC-Expression benötigt. Deshalb wurden vorangehend hochexprimierende Klone mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt und für die Immunaффinitätschromatographie ausgewählt. Dabei handelte es sich für die C1R-DLA-88\*03201-Zellen um den Klon F8 und für die K562-DLA-88\*03201-Zellen um den Klon D6. Tabelle 17 gibt einen Überblick über die verwendeten Zellzahlen pro Experiment sowie die zugehörigen Mengen an isolierten Peptiden.

**Tabelle 17: Übersicht der durchgeführten Immunaффinitätschromatographien.**

Experiment	Zellart	Zellzahl	Klon	Gesamtpeptidzahl
<b>1</b>	C1R-DLA-88*03201	$1,1 \times 10^9$	F8	314
<b>2</b>	C1R-DLA-88*03201	$1,12 \times 10^9$	F8	89
<b>3</b>	K562-DLA-88*03201	$1 \times 10^9$	D6	232
<b>Vereinigung Ex. 1 +2 + 3</b>				635

Die ausgewählten Zellen wurden, wie unter 3.2.3.2. beschrieben, lysiert und das Zelllysate wurde im Anschluss zyklisch durch eine Immunaффinitätssäule geleitet, in der sich Sepharosegekoppelter BBM.1-Antikörper befand. Durch die selektive Bindung des Antikörpers an das

$\beta_2$ -Mikroglobulin konnten somit MHC-Moleküle separiert und deren Peptidliganden durch die Verwendung von TFA-Lösung nachfolgend eluiert werden. Nach Aufreinigung und Konzentration des Peptideluats erfolgte die massenspektrometrische Analyse am LTQ-Orbitrap-XL-Massenspektrometer durch Daniel Kowalewski (Universität Tübingen). Wobei bei dem zweiten Experiment die Probe aus organisatorischen Gründen vorab komplett eingeeengt werden musste. Es wurden pro Experiment drei Replikate gemessen, die für die weitergehende Auswertung vereinigt wurden. Zur Charakterisierung des Bindemotives für DLA-88\*03201 sollten Peptide, die von humanen MHC-Komplexen stammten, nicht miteinbezogen werden. Aus diesem Grund mussten im Fall der C1R-Zellen zunächst die HLA-B\*35:03- und HLA-C\*04:01-Liganden von der Gesamtpeptidzahl abgezogen werden. Hierfür wurden die gefundenen C1R-DLA-88\*03201-Peptide mittels des Programms Ligandosphere untersucht, welches eine Epitopvorhersage durch den gleichzeitigen Abgleich der isolierten Peptide mit den zwei Peptiddatenbanken SYFPEITHI [31] und netMHC-3.4 [153] ermöglichte. Hierdurch konnten mögliche HLA-Restriktionen der Peptidsequenzen bestimmt und eine Zuordnung der Peptide vorgenommen werden. Tabelle 18 gibt einen Überblick über den prozentualen Anteil der mittels des Vorhersageprogramms bestimmten HLA-Liganden an der Gesamtzahl an gefundenen Peptiden.

**Tabelle 18: Übersicht über die HLA-assozierten und vermutlich DLA-88\*03201-assozierten Peptide pro Experiment.**

Exp.	Peptide gesamt	DLA- 88*03201	% DLA- 8*03201	% HLA- B*35:03		% HLA- C*04:01	
					netMHC-3.4 SYFPEITHI	netMHC-3.4 SYFPEITHI	
1	314	85	27	2,2	-	0,3	70,4
2	89	16	18	1,1	-	-	80,9
3	232	232	100	-	-	-	-

Hierbei war der Prozentsatz der HLA-B\*35:03-assozierten Liganden an der Gesamtpeptidzahl für beide C1R-DLA-88\*03201-Experimente vergleichsweise niedrig, der Anteil an HLA-C\*04:01-assozierten Liganden hingegen relativ hoch. Die Experimente 1 und 2 mit C1R-DLA-

88\*03201-Zellen lieferten im Vergleich zu Experiment 3, für das K562-DLA-88\*03201-Zellen verwendet wurden, deutlich weniger potentielle DLA-88\*03201-Liganden. Tabelle 19 stellt die Anzahl an übereinstimmenden potentiellen DLA-88\*03201-Liganden im Vergleich der durchgeführten Experimente dar. Wie zu erwarten, zeigt hierbei die Gegenüberstellung von den Experimenten 1 und 3, also der Experimente, die auch die größte Peptidausbeute lieferten, die größte Zahl an Übereinstimmungen.

**Tabelle 19: Übersicht über die übereinstimmenden potentiellen DLA-88\*03201-Liganden im Vergleich der durchgeführten Experimente.**

Experiment	Anzahl übereinstimmender Peptide
<b>1 + 2</b>	1
<b>1 + 3</b>	12
<b>2 + 3</b>	5
<b>1 + 2 + 3</b>	1

In Abbildung 19 sind die Längenverteilungen der vermutlichen DLA-88\*03201-Peptide aus den verschiedenen Experimenten dargestellt. Hierbei kamen in Experiment 1 und 3 jeweils Peptide mit einer Länge von 9 Aminosäuren am häufigsten vor, wohingegen im Experiment 2 Peptide mit einer Länge von 11 Aminosäuren überwogen. Letztgenannte Aminosäuren rangierten in Experiment 1 und 3 jeweils an zweiter Stelle. Bei Betrachtung der Längenverteilung aller gefundenen Peptide herrschten Nonamere vor, jedoch machten Undecamere ebenfalls einen hohen Prozentsatz aus. Die Kombination der bisherigen Ergebnisse legte an dieser Stelle den Verdacht nahe, dass die Transfektion der C1R-Zellen mit dem Allel DLA-88\*03201 nicht vollständig funktioniert haben könnte und somit nur Teile der transfizierten genetischen Information in das Genom der Zelle integriert wurden. Gründe für diese Annahme wurden zum einen in Abbildung 16 geliefert, in der die transfizierten Zellen nur eine relativ geringe Steigerung der Fluoreszenzintensität der BBM.1-Antikörperkurve gegenüber der W6/32-Antikörperkurve im Vergleich mit den nicht transfizierten Zellen aufwiesen.



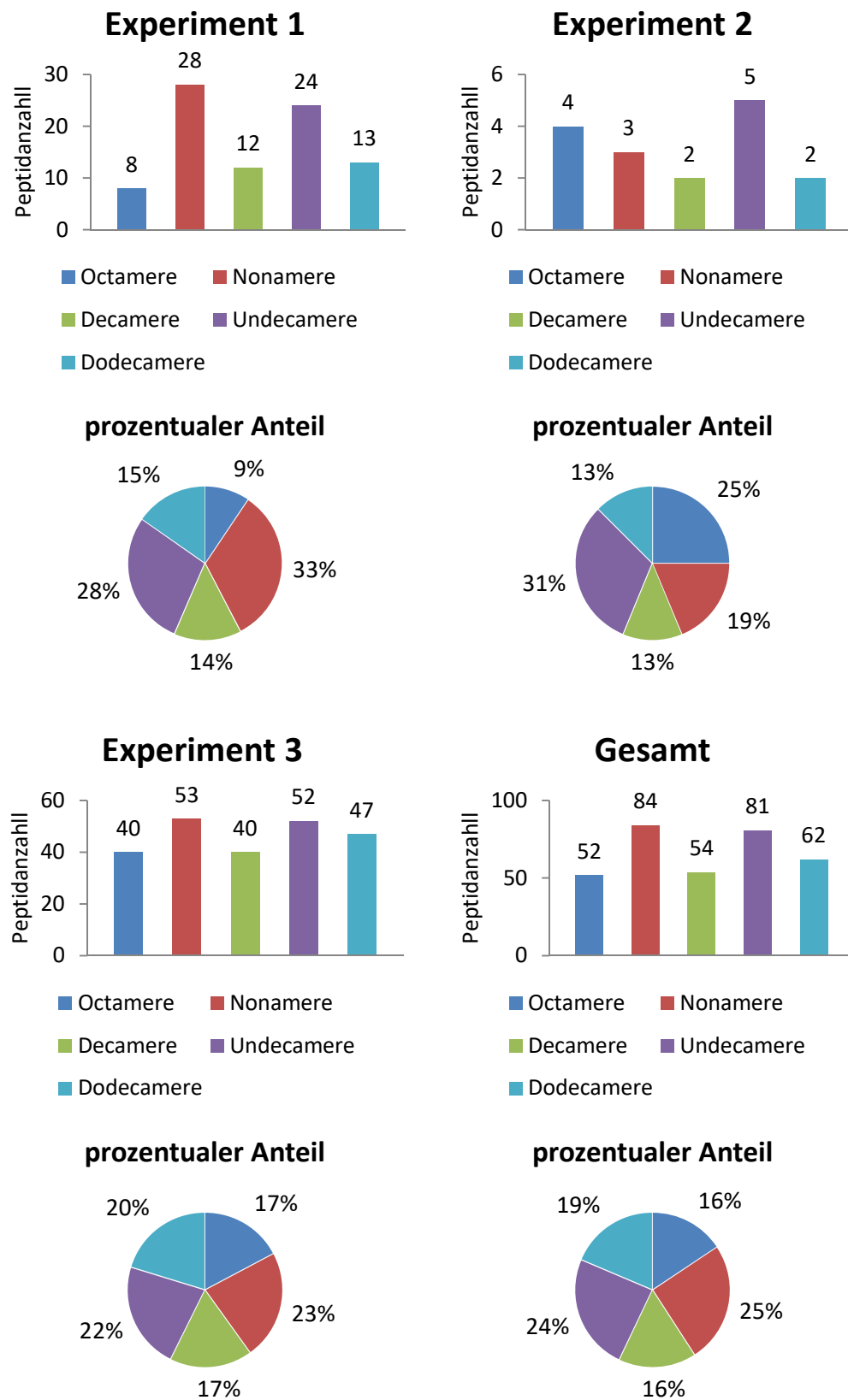


Abbildung 19: Längenverteilung der Peptide aus den verschiedenen Experimenten.

Dargestellt sind jeweils die absoluten Peptidzahlen sowie der prozentuale Anteil an der Gesamtpeptidzahl.

Zum anderen auch von Tabelle 19 veranschaulicht, der zufolge nur eine sehr geringe Anzahl an übereinstimmenden Peptiden beim Vergleich der vermutlichen DLA-88\*03201-Peptide in den drei Experimente untereinander detektiert werden konnte und von Abbildung 19, in der insbesondere die Längenverteilung der vermutlichen DLA-88\*03201-Peptide des zweiten Experiments deutlich von der Längenverteilung der anderen zwei abwich. Da bei der Zuordnung der Peptide zu den jeweiligen MHC-Allelen mittels Ligandosphere keine Vorhersage über mögliche Kontaminanten (Peptide, die keine MHC-Liganden darstellen) gemacht werden konnte und der Ursprung der identifizierten Peptide weitergehend überprüft werden sollte, wurden die Peptide einer Länge des ersten und zweiten Experiments zusätzlich mittels des Servers GibbsCluster-2.0 analysiert. Dieser erlaubt die Aufschlüsselung von Peptidsequenzdatensätzen in rekonstruierte Bindemotive, wodurch in der Folge, durch den Abgleich mit bereits bekannten Bindemotiven, eine Aussage über die vermutliche MHC-Allel-Annotation der Peptide getroffen werden kann. Abbildung 20 zeigt jeweils die erzielten Analyseergebnisse der identifizierten Nonamere des ersten (A) und zweiten (B) Experiments mit C1R-DLA-88\*03201-Zellen. Hierbei korreliert die Häufigkeit der Aminosäuren innerhalb der zugeordneten Gruppen mit der Größe der Buchstaben der Aminosäuren-Codes. Die Einteilung der identifizierten Peptide in bis zu drei Gruppen erfolgte anhand von gruppenspezifischen Ähnlichkeiten in ihren Aminosäuresequenzen. Im oberen Teil des Schaubildes sind die Ergebnisse des ersten Experiments dargestellt (A). Als Erstes fällt auf, dass die identifizierten Liganden insgesamt in drei unterschiedliche Bindemotivgruppen aufgeteilt werden konnten, wobei sich jedoch die zweite und die dritte Gruppe in ihrem Motiv stark ähnelten. Das Bindemotiv der ersten Gruppe, dem insgesamt 21 Peptide zugeordnet werden konnten, zeigte eine Dominanz von Prolin (P) an Position 2 sowie eine starke Präsenz von Leucin (L), Isoleucin (I) und Valin (V) am C-Terminus. Das Bindemotiv der zweiten Gruppe, dem 61 Peptide zugeordnet werden konnten, und das der dritten Gruppe mit 111 zugeordneten Peptiden zeigten jeweils eine Dominanz von Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) an Position 2 sowie eine Dominanz von Asparaginsäure (D) an Position 3. Außerdem fand sich eine starke Präsenz der Aminosäuren Leucin, Phenylalanin und Valin (V) an Position 9. Insgesamt konnten 7 Peptide keiner Gruppe zugeordnet werden und wurden somit als mögliche Kontaminanten von der Analyse ausgeschlossen. Bei Betrachtung der Analyseergebnisse von identifizierten Nonameren aus dem zweiten Experiment (B) fiel zunächst auf, dass hier nur eine Unterteilung in zwei Gruppen möglich gewesen war.

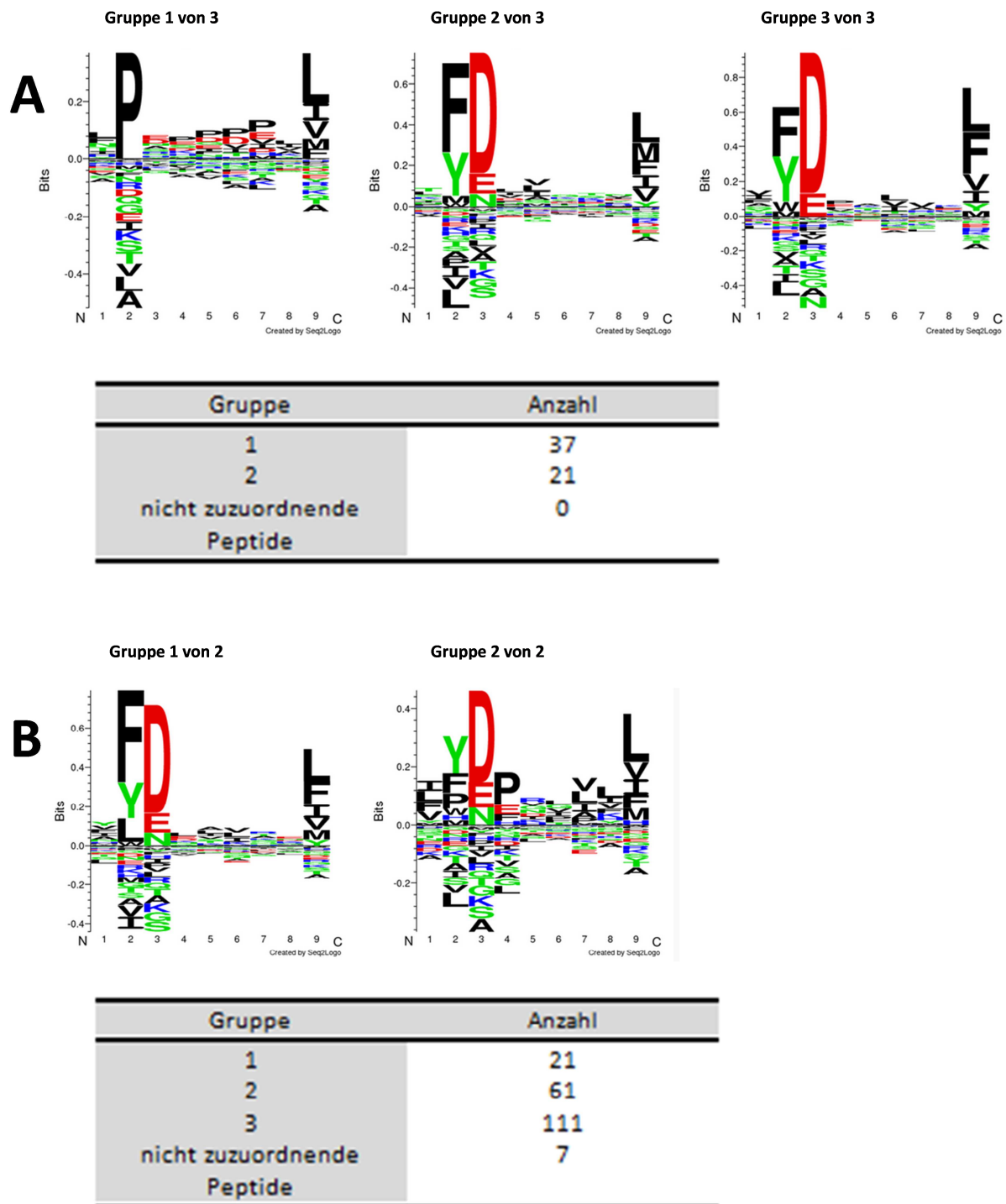


Abbildung 20: Rekonstruierte Bindemotive des ersten und zweiten Experiments.

- (A) Ergebnis der Gruppierung von identifizierten Nonameren des ersten Experiments und Angabe der Anzahl an zugeordneten Peptiden je Gruppe.
- (B) Ergebnis der Gruppierung von identifizierten Nonameren des zweiten Experiments und Angabe der Anzahl an zugeordneten Peptiden je Gruppe.

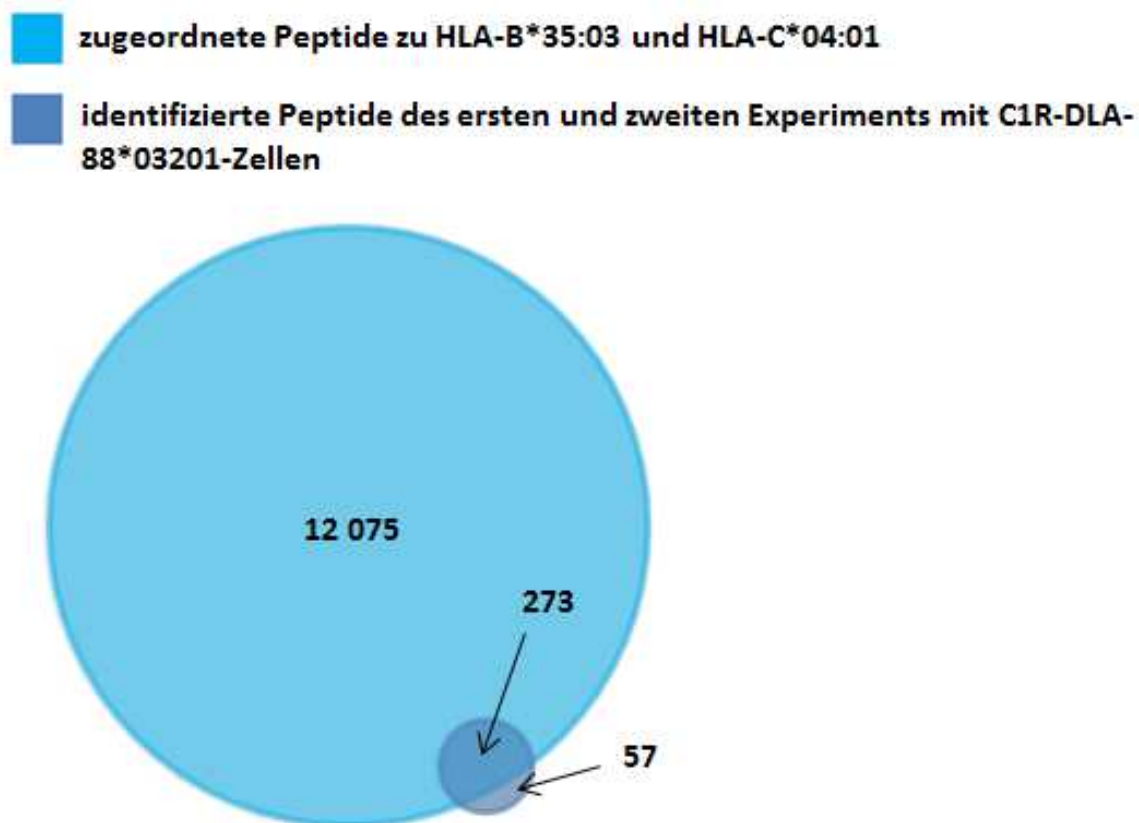
Die Abbildung wurde mit Hilfe des Servers GibbsCluster-2.0 erstellt.

Beide Gruppen zeigten eine relativ hohe Übereinstimmung bezüglich der Häufigkeit bestimmter Aminosäuren an definierten Positionen beim Abgleich mit der zweiten und dritten Gruppe aus dem ersten Experiment. Es zeigte sich ebenfalls eine Dominanz von Phenylalanin und Tyrosin an Position 2, Asparaginsäure an Position 3 und von Leucin, Phenylalanin und Valin an Position 9. Der ersten Gruppe konnten jeweils 37 Peptide zugeordnet werden, der zweiten Gruppe 21. Im Anschluss wurden die rekonstruierten Bindemotive aus Abbildung 20 mit den bereits publizierten Bindemotiven für die Allele HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01 (Tabelle 20) verglichen. Hierbei wurde eine Übereinstimmung der dominierenden Aminosäuren an Position 2 und 3 aus der ersten Gruppe des ersten Experiments mit den Ankerpositionen des Bindemotives von HLA-B\*35:03 deutlich.

**Tabelle 20: Publierte Bindemotive für die Allele HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01.**

Bindemotiv von HLA-B*35:03 gemäß [157]									
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker		P							M
									L
weitere häufige Aminosäuren	A	M	E	V	D	Y			F
		I	G	M	N	T			
		L	N	T	G	N			
		F	D	I					
		V	K	G					
			H						
Bindemotiv von HLA-C*04:01 gemäß [158]									
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anker		F	D						L
starke Aminosäuren		Y					V		F
weitere häufige Aminosäuren	V			E	A	I	A	E	M
	F			P	V	V			V
	Y			V		L			
	S			L					
				D					

Außerdem bestand eine sehr starke Übereinstimmung der dominierenden Aminosäuren der restlichen Gruppen des ersten und zweiten Experiments mit den Ankerpositionen und starken Aminosäuren des Bindemotives von HLA-C\*04:01. Da die auf diese Weise durchgeführte Auswertung der Daten nur eine Zuordnung der Peptide zu rekonstruierten Bindemotiven, die sehr stark den Bindemotiven von HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01 ähnelten, erlaubte und somit keine Hinweise auf ein mögliches drittes, DLA-zuzuordnendes Bindemotiv geliefert wurde, wurde anschließend noch auf eine weitere Weise versucht, Peptide, die vom DLA stammten, zu detektieren. Hierzu wurden die 403 identifizierten Peptide des ersten und zweiten Experiments mit C1R-DLA-88\*03201-Zellen (Tabelle 18) mit Peptidlisten, die insgesamt 39945 HLA-B\*35:03- und HLA-C\*04:01-assoziierte Peptide beinhalteten, abgeglichen (Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Vergleichende Analyse von HLA-B\*35:03- und HLA-C\*04:01-zugeordneten Peptiden mit den identifizierten Peptiden des ersten und zweiten Experiments mit C1R-DLA-88\*03201.

Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms <http://www.biovenn.nl> erstellt.

Die Analyse ergab, dass jeweils 12 075 unterschiedliche Peptide innerhalb des Peptidpools von 39 945 Peptiden vorkamen und von diesen 273 Peptide auch den Experimenten mit C1R-

DLA-88\*03201-Zellen zugeordnet werden konnten. Außerdem wurde ersichtlich, dass von den Experimenten mit C1R-DLA-88\*03201-Zellen 57 Peptide nicht mit den B\*35:03- und C\*04:01-assoziierten Peptiden übereinstimmten. Daher wurde davon ausgegangen, dass diese Peptide nicht von HLA-Molekülen präsentiert wurden und folglich vom DLA stammten. Somit wurden diese 57 Peptide gemeinsam mit den Peptiden des dritten Experiments für die weitere Analyse der Bindspezifitäten von DLA-88\*03201 verwendet. Die Peptide des dritten Experiments wurden ausnahmslos zur Bestimmung des Bindemotives verwendet, da die verwendeten K562-Zellen im natürlichen Zustand keine eigene MHC-Klasse-I-Expression aufwiesen [159] und somit davon auszugehen war, dass die identifizierten Peptide des dritten Experiments vermutlich vom DLA stammten. Zur Bestimmung des Bindemotives von DLA-88\*03201 wurde weitergehend mit Hilfe des Programms Motiffinder die prozentuale Verteilung der Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen für die Octamere, Nonamere und Decamere getrennt angegeben (Abbildung 22). Aminosäuren, die an einer Position mit einer Häufigkeit von 10–40 % vorkamen, sind hellgelb markiert, Aminosäuren mit einer Häufigkeit von 40–70 % gelb. Zusätzlich wurden die Aminosäuren nach ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften in Gruppen unterteilt und deren Häufigkeit an den verschiedenen Sequenzpositionen wurde ebenfalls bestimmt. Hellgelb wurden hierbei Aminosäuregruppen mit einer Häufigkeit von 30–50 % gekennzeichnet, gelb Aminosäuregruppen mit einer Häufigkeit von 50–90 %. Es wurde angenommen, dass der prozentuale Anteil einer Aminosäure oder einer Aminosäuregruppe an einer spezifischen Position mit der Neigung, durch MHC-Moleküle gebunden zu werden, korreliert. Bei Betrachtung der Aminosäureverteilung an erster Position innerhalb der Peptidsequenzen zeigten alle drei Peptidlängen ein einheitliches Bild. Hier wurden jeweils die höchsten prozentualen Werte für die Aminosäuregruppe AST+V (Alanin, Serin, Threonin und Valin) und die Gruppe ILV (Isoleucin, Leucin und Valin) erzielt. An zweiter Stelle sowie an dritter Position bei den Nonameren und Decameren konnte eine Dominanz der AST+V-Gruppe vermerkt werden – im Gegensatz zu den Octameren, bei denen die RHK-Gruppe (Arginin, Histidin, Lysin) an dritter Stelle dominierte. Die folgenden Positionen der Peptidsequenzen waren von einem relativ uneinheitlichen Bild geprägt, jedoch zeigte sich für die Positionen 5, 6 und 7 jeweils auch eine Dominanz der Gruppe AST+V. Am C-Terminus konnte bei den Octameren und Decameren die Gruppe ILV am häufigsten bestimmt werden, bei den Nonameren folgte diese als zweithäufigste nach der Gruppe FWY (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin).

nicht gebiaste Octamere										
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amino Säure										
A	10,20	8,16	8,16	4,08	6,12	12,24	4,08	8,16	0,00	0,00
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	0,00	4,08	2,04	10,20	2,04	18,37	12,24	10,20	0,00	0,00
E	2,04	12,24	6,12	4,08	6,12	8,16	8,16	14,29	0,00	0,00
F	16,33	2,04	8,16	8,16	0,00	2,04	2,04	8,16	0,00	0,00
G	2,04	14,29	2,04	4,08	10,20	4,08	8,16	4,08	0,00	0,00
H	2,04	4,08	6,12	0,00	6,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I	6,12	4,08	6,12	8,16	4,08	0,00	8,16	6,12	0,00	0,00
K	2,04	4,08	16,33	6,12	12,24	12,24	16,33	12,24	0,00	0,00
L	12,24	2,04	10,20	6,12	4,08	6,12	8,16	18,37	0,00	0,00
M	6,12	0,00	0,00	10,20	2,04	0,00	2,04	0,00	0,00	0,00
N	4,08	2,04	10,20	2,04	4,08	2,04	2,04	0,00	0,00	0,00
P	8,16	2,04	2,04	14,29	16,33	6,12	4,08	0,00	0,00	0,00
Q	0,00	4,08	4,08	0,00	2,04	2,04	0,00	8,16	0,00	0,00
R	0,00	6,12	4,08	2,04	4,08	0,00	6,12	2,04	0,00	0,00
S	2,04	8,16	2,04	4,08	10,20	16,33	4,08	0,00	0,00	0,00
T	0,00	6,12	6,12	8,16	4,08	8,16	2,04	4,08	0,00	0,00
V	22,45	12,24	4,08	4,08	6,12	2,04	12,24	2,04	0,00	0,00
W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	4,08	4,08	2,04	4,08	0,00	0,00	0,00	2,04	0,00	0,00
Gruppen										
DE	2,04	16,33	8,16	14,29	8,16	26,53	20,41	24,49	0,00	0,00
RHK	4,08	14,29	26,53	8,16	22,45	12,24	22,45	14,29	0,00	0,00
FWY	20,41	6,12	10,20	12,24	0,00	2,04	2,04	10,20	0,00	0,00
AST	12,24	22,45	16,33	16,33	20,41	36,73	10,20	12,24	0,00	0,00
AST+V	34,69	34,69	20,41	20,41	26,53	38,78	22,45	14,29	0,00	0,00
ILV	40,82	18,37	20,41	18,37	14,29	8,16	28,57	26,53	0,00	0,00

nicht gebiaste Nonamere										
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amino Säure										
A	17,65	10,29	13,24	5,88	7,35	5,88	5,88	4,41	8,82	0,00
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	1,47	5,88	8,82	2,94	7,35	5,88	13,24	8,82	8,82	0,00
E	1,47	2,94	4,41	2,94	5,88	4,41	5,88	4,41	8,82	0,00
F	4,41	2,94	2,94	7,35	1,47	2,94	2,94	2,94	20,59	0,00
G	4,41	7,35	8,82	7,35	5,88	11,76	8,82	5,88	4,41	0,00
H	0,00	1,47	5,88	4,41	11,76	4,41	1,47	0,00	2,94	0,00
I	2,94	5,88	4,41	5,88	1,47	1,47	5,88	8,82	1,47	0,00
K	7,35	5,88	1,47	5,88	8,82	10,29	10,29	10,29	2,94	0,00
L	8,82	4,41	5,88	7,35	4,41	7,35	5,88	7,35	17,65	0,00
M	4,41	2,94	2,94	0,00	1,47	1,47	0,00	0,00	1,47	0,00
N	8,82	5,88	2,94	2,94	2,94	5,88	1,47	5,88	1,47	0,00
P	7,35	4,41	2,94	20,59	8,82	8,82	4,41	4,41	0,00	0,00
Q	0,00	4,41	2,94	4,41	7,35	7,35	4,41	4,41	2,94	0,00
R	7,35	2,94	8,82	1,47	1,47	0,00	1,47	10,29	4,41	0,00
S	1,47	11,76	8,82	1,47	5,88	10,29	13,24	7,35	1,47	0,00
T	4,41	4,41	2,94	5,88	7,35	4,41	5,88	7,35	1,47	0,00
V	17,65	13,24	8,82	10,29	7,35	5,88	4,41	4,41	2,94	0,00
W	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	1,47	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	0,00	2,94	2,94	2,94	1,47	0,00	4,41	2,94	7,35	0,00
Gruppen										
DE	2,94	8,82	13,24	5,88	13,24	10,29	19,12	13,24	17,65	0,00
RHK	14,71	10,29	16,18	11,76	22,06	14,71	13,24	20,59	10,29	0,00
FWY	4,41	5,88	5,88	10,29	4,41	4,41	7,35	5,88	27,94	0,00
AST	23,53	26,47	25,00	13,24	20,59	20,59	25,00	19,12	11,76	0,00
AST+V	41,18	39,71	33,82	23,53	27,94	26,47	29,41	23,53	14,71	0,00
ILV	29,41	23,53	19,12	23,53	13,24	14,71	16,18	20,59	22,06	0,00

nicht gebiaste Decamere										
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amino Säure										
A	10,00	14,00	12,00	8,00	16,00	18,00	0,00	6,00	2,00	4,00
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	2,00	8,00	8,00	8,00	4,00	10,00	4,00	6,00	6,00	8,00
E	8,00	6,00	8,00	4,00	18,00	12,00	8,00	10,00	4,00	10,00
F	14,00	2,00	4,00	4,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	10,00
G	2,00	4,00	16,00	8,00	10,00	2,00	12,00	10,00	6,00	0,00
H	2,00	4,00	4,00	4,00	4,00	2,00	10,00	0,00	4,00	2,00
I	0,00	0,00	4,00	6,00	2,00	2,00	0,00	4,00	8,00	0,00
K	2,00	8,00	6,00	12,00	0,00	12,00	8,00	8,00	8,00	2,00
L	12,00	8,00	8,00	2,00	0,00	4,00	12,00	8,00	8,00	30,00
M	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
N	2,00	0,00	4,00	4,00	2,00	2,00	0,00	4,00	4,00	0,00
P	12,00	8,00	0,00	14,00	18,00	10,00	6,00	16,00	0,00	0,00
Q	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00	4,00	4,00	4,00	10,00	4,00
R	6,00	4,00	2,00	4,00	4,00	6,00	2,00	6,00	14,00	4,00
S	4,00	4,00	8,00	6,00	14,00	4,00	12,00	2,00	8,00	2,00
T	6,00	4,00	4,00	12,00	2,00	4,00	10,00	4,00	8,00	10,00
V	16,00	18,00	12,00	4,00	4,00	6,00	6,00	12,00	10,00	4,00
W	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00
Y	2,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	10,00
Gruppen										
DE	10,00	14,00	16,00	12,00	22,00	22,00	12,00	16,00	10,00	18,00
RHK	10,00	16,00	12,00	20,00	8,00	20,00	20,00	14,00	26,00	8,00
FWY	16,00	4,00	4,00	4,00	2,00	2,00	4,00	0,00	0,00	20,00
AST	20,00	22,00	24,00	26,00	32,00	26,00	22,00	12,00	18,00	16,00
AST+V	36,00	40,00	36,00	30,00	36,00	32,00	28,00	24,00	28,00	20,00
ILV	28,00	26,00	24,00	12,00	6,00	12,00	18,00	24,00	26,00	34,00

Abbildung 22: Prozentuale Verteilung der Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen der Octamere, Nonamere und Decamere der ausgewählten Peptide aller drei Experimente.

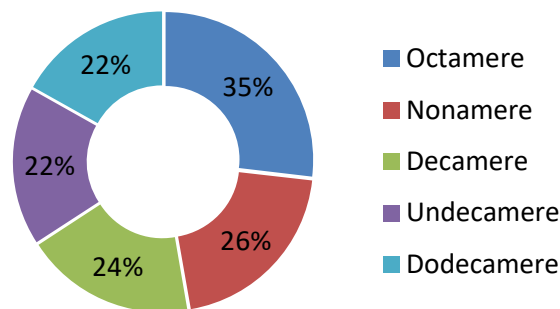
Für jede Peptidlänge wird die Häufigkeit der Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen angegeben. Die Aminosäuren mit einer Häufigkeit von 10–40 % sind hellgelb unterlegt, Aminosäuren mit einer Häufigkeit von 40–70 % gelb. Jeweils im linken unteren Spaltenbereich wurde eine Einteilung der Aminosäuren nach physikalisch-chemischen Eigenschaften in Aminosäuregruppen vorgenommen. In hellgelb sind Aminosäuregruppen mit einer Häufigkeit von 30–50 % an den unterschiedlichen Sequenzpositionen markiert, Aminosäuregruppen mit einer Häufigkeit von 50–90 % sind gelb dargestellt.

Bei Betrachtung der einzelnen Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen aller drei Auswertungen konnten ebenfalls einige Gemeinsamkeiten ausgemacht werden. Es zeigte sich jeweils eine Dominanz von Valin an Position 1, eine Dominanz von Prolin an Position 4 sowie C-terminal eine Dominanz von Leucin. Für die Transfektion mit dem caninen MHC-Klasse-I-Allel DLA-88\*03201 waren humane C1R- und K562-Zellen verwendet worden. Somit ist davon auszugehen, dass Peptide, die auf den MHC-Komplexen präsentiert wurden, vorher durch eine humane Antigenprozessierungsmaschinerie zugeschnitten und selektiert wurden. Hierzu gehören als wesentliche Bestandteile das Proteasom als multikatalytische Protease sowie der TAP-Komplex als Transporteinheit. In vorausgegangenen Untersuchungen zeigte der humane TAP-Komplex vor allem eine Selektivität für Peptide mit hydrophobem oder basischem C-Terminus beim Transport in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums [47, 48]. Es wird somit angenommen, dass die Auswahl der Peptide durch den TAP-Komplex einen entscheidenden Einfluss darauf hat, welche Peptide im Anschluss auf den MHC-Komplexen gebunden werden und welche nicht. Aus diesem Grund wurden von der Peptidgesamtzahl einer Länge aus allen Experimenten jeweils die Peptide mit sauren oder polaren Seitenketten am C-Terminus abgezogen und nur die verbleibenden Peptide zur weiteren Analyse verwendet. Die Peptide wurden also gebiast. Somit konnten Peptide, die vermutlich nicht von den MHC-Molekülen stammten, vor der Bestimmung des Bindemotives ausgeschlossen werden. In Tabelle 21 ist die Anzahl der Peptide mit polaren oder sauren Seitenketten am C-Terminus, die unter den ausgewählten Peptiden aller drei Experimente gefunden wurden, dargestellt. Hierbei wird jeweils die Peptidzahl pro Aminosäure der zugehörigen Peptidlänge zugeordnet. Ergänzend hierzu zeigt Abbildung 23 den prozentualen Anteil der gefundenen Peptide mit saurem oder polarem C-Terminus an der Gesamtzahl aller ausgewählten Peptide einer Länge.



**Tabelle 21:** Anzahl an Peptiden verschiedener Längen mit saurem oder polarem C-Terminus aus der Gesamtzahl aller ausgewählten Peptide.

	C	D	E	G	N	Q	S	gesamt
<b>8er</b>	-	5	7	1	0	4	0	17
<b>9er</b>	-	6	6	3	1	2	0	18
<b>10er</b>	-	4	5	0	0	2	1	12
<b>11er</b>	-	4	3	2	1	3	2	15
<b>12er</b>	-	6	6	1	2	0	0	12

**Abbildung 23:** Prozentualer Anteil der Peptide mit sauren oder polaren Seitenketten am C-Terminus an der Peptidgesamtzahl einer Länge.

Für die gebiasteten Peptide wurde anschließend erneut die Häufigkeit der Aminosäuren an Sequenzpositionen innerhalb der Octamere, Nonamere und Decamere der ausgewählten Peptide aller drei Experimente ermittelt (Abbildung 24). Hierbei zeigte sich ein ähnliches Bild wie auch schon in Abbildung 22, nun mit etwas veränderten Werten. An erster Position war eine Dominanz der Aminosäuregruppen AST+V und ILV zu vermerken. An zweiter und dritter Stelle eine Dominanz der AST+V-Gruppe und außerdem ein relativ häufiges Auftreten der Gruppen AST+V und AST an Position 5, 6 und 7. Am C-Terminus wurden jeweils hohe Werte für die Gruppe ILV und FWY erzielt. Bei der Betrachtung der einzelnen Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen aller drei Auswertungen zeigte sich nun neben Valin

eine zusätzliche Dominanz von Alanin an Position 1, eine Dominanz von Prolin an Stelle 4 sowie neben Leucin am C-Terminus zeigten sich zusätzlich hohe Werte für Phenylalanin.

Im Anschluss wurde nun das vermutliche Bindemotiv für das Allel DLA-88\*03201 mit dem Programm WebLogo bestimmt und visualisiert (Abbildung 25). Hierbei wurden jeweils die gebiasten und die nicht gebiasten Nonamere der im Voraus ausgewählten Peptide verwendet, da diese zahlenmäßig am häufigsten vertreten waren. Es zeigte sich bei der Visualisierung des Bindemotives, das mit den nicht gebiasten DLA-88\*03201-Nonameren erstellt wurde (Abbildung 25 A), eine Dominanz von Arginin und Valin am N-Terminus sowie eine erhöhte Präsenz von Prolin an vierter Position und von Asparaginsäure (D) an Position 7. Außerdem konnte ein relativ häufiges Auftreten von Phenylalanin und Leucin am C-Terminus detektiert werden. Verglich man dieses vermutliche Bindemotiv von DLA-88\*03201 mit dem, das mittels der identifizierten gebiasten Nonamere erstellt wurde (Abbildung 25 B), zeigte sich eine Zunahme der Häufigkeit einiger Aminosäuren an spezifischen Positionen innerhalb der Peptidsequenzen und somit ein noch etwas deutlicheres Hervortreten des vermutlichen Bindemotives für DLA-88\*03201. Es kann die Vermutung gestellt werden, dass es sich bei Arginin und Valin an Position 1 und Phenylalanin und Leucin an Position 9 möglicherweise um sogenannte Ankeramino-säuren handelt, mit denen das Peptid am MHC-Molekül verankert ist. Außerdem konnten die Position 4 mit der Aminosäure Prolin und die Position 7 mit den Aminosäuren Asparaginsäure als vermutliche Hilfsanker identifiziert werden.

gebiaste Octamere										
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amino Säure										
A	12,50	3,13	12,50	3,13	0,00	9,38	6,25	12,50	0,00	0,00
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	0,00	3,13	3,13	15,63	3,13	21,88	15,63	0,00	0,00	0,00
E	3,13	6,25	6,25	3,13	6,25	12,50	9,38	0,00	0,00	0,00
F	15,63	3,13	9,38	9,38	0,00	3,13	3,13	12,50	0,00	0,00
G	3,13	18,75	0,00	6,25	9,38	3,13	6,25	3,13	0,00	0,00
H	3,13	6,25	3,13	0,00	6,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
I	3,13	6,25	3,13	3,13	6,25	0,00	3,13	9,38	0,00	0,00
K	0,00	3,13	15,63	6,25	9,38	6,25	9,38	18,75	0,00	0,00
L	18,75	3,13	15,63	9,38	6,25	6,25	9,38	28,13	0,00	0,00
M	3,13	0,00	0,00	9,38	3,13	0,00	3,13	0,00	0,00	0,00
N	6,25	3,13	12,50	3,13	3,13	3,13	0,00	0,00	0,00	0,00
P	3,13	3,13	0,00	18,75	15,63	3,13	6,25	0,00	0,00	0,00
Q	0,00	3,13	3,13	0,00	3,13	3,13	0,00	0,00	0,00	0,00
R	0,00	9,38	3,13	0,00	6,25	0,00	9,38	3,13	0,00	0,00
S	3,13	9,38	0,00	6,25	9,38	15,63	3,13	0,00	0,00	0,00
T	0,00	6,25	6,25	6,25	6,25	9,38	3,13	6,25	0,00	0,00
V	18,75	12,50	3,13	0,00	6,25	3,13	12,50	3,13	0,00	0,00
W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	6,25	0,00	3,13	0,00	0,00	0,00	0,00	3,13	0,00	0,00
Gruppen										
DE	3,13	9,38	9,38	18,75	9,38	34,38	25,00	0,00	0,00	0,00
RHK	3,13	18,75	21,88	6,25	21,88	6,25	18,75	21,88	0,00	0,00
FWY	21,88	3,13	12,50	9,38	0,00	3,13	3,13	15,63	0,00	0,00
AST	15,63	18,75	18,75	15,63	15,63	34,38	12,50	18,75	0,00	0,00
AST+V	34,38	31,25	21,88	15,63	21,88	37,50	25,00	21,88	0,00	0,00
ILV	40,63	21,88	21,88	12,50	18,75	9,38	25,00	40,63	0,00	0,00

gebiaste Nonamere										
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amino Säure										
A	20,00	8,00	10,00	8,00	8,00	4,00	8,00	6,00	12,00	0,00
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	0,00	6,00	12,00	4,00	8,00	4,00	14,00	6,00	0,00	0,00
E	2,00	2,00	2,00	2,00	8,00	4,00	6,00	6,00	0,00	0,00
F	6,00	2,00	4,00	6,00	2,00	4,00	4,00	2,00	28,00	0,00
G	4,00	8,00	8,00	4,00	6,00	8,00	10,00	8,00	0,00	0,00
H	0,00	2,00	6,00	4,00	6,00	2,00	2,00	0,00	4,00	0,00
I	4,00	6,00	4,00	6,00	2,00	2,00	6,00	8,00	2,00	0,00
K	6,00	8,00	2,00	6,00	10,00	10,00	14,00	12,00	4,00	0,00
L	8,00	4,00	4,00	6,00	6,00	10,00	4,00	4,00	24,00	0,00
M	6,00	2,00	4,00	0,00	0,00	2,00	0,00	0,00	2,00	0,00
N	8,00	4,00	4,00	4,00	4,00	6,00	0,00	6,00	0,00	0,00
P	6,00	4,00	4,00	22,00	12,00	10,00	4,00	6,00	0,00	0,00
Q	0,00	6,00	2,00	6,00	6,00	10,00	4,00	4,00	0,00	0,00
R	8,00	4,00	8,00	0,00	0,00	0,00	2,00	12,00	6,00	0,00
S	2,00	12,00	12,00	0,00	6,00	10,00	10,00	9,00	2,00	0,00
T	0,00	4,00	2,00	8,00	6,00	4,00	8,00	4,00	2,00	0,00
V	20,00	14,00	8,00	10,00	8,00	8,00	2,00	4,00	4,00	0,00
W	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Y	0,00	4,00	4,00	4,00	0,00	0,00	2,00	4,00	10,00	0,00
Gruppen										
DE	2,00	8,00	14,00	6,00	16,00	8,00	20,00	12,00	0,00	0,00
RHK	14,00	14,00	16,00	10,00	16,00	12,00	18,00	24,00	14,00	0,00
FWY	6,00	6,00	8,00	10,00	4,00	6,00	6,00	38,00	0,00	0,00
AST	22,00	24,00	24,00	16,00	20,00	18,00	26,00	18,00	16,00	0,00
AST+V	42,00	38,00	32,00	26,00	28,00	26,00	28,00	22,00	20,00	0,00
ILV	32,00	24,00	16,00	22,00	16,00	20,00	12,00	16,00	30,00	0,00

gebiaste Decamere										
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amino Säure										
A	10,53	15,79	15,79	7,89	15,79	13,16	0,00	7,89	2,63	5,26
C	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
D	2,63	7,89	7,89	7,89	5,26	10,53	2,63	5,26	2,63	0,00
E	5,26	2,63	7,89	2,63	15,79	13,16	5,26	10,53	2,63	0,00
F	13,16	2,63	2,63	2,63	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	13,16
G	2,63	5,26	18,42	10,53	10,53	2,63	10,53	10,53	5,26	0,00
H	2,63	5,26	5,26	2,63	2,63	2,63	10,53	0,00	5,26	2,63
I	0,00	0,00	5,26	7,89	2,63	2,63	0,00	2,63	2,63	0,00
K	0,00	7,89	7,89	13,16	0,00	10,53	7,89	7,89	10,53	2,63
L	13,16	7,89	5,26	2,63	0,00	5,26	15,79	10,53	10,53	39,47
M	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00
N	0,00	0,00	0,00	5,26	2,63	2,63	0,00	5,26	5,26	0,00
P	13,16	7,89	0,00	13,16	18,42	7,89	7,89	15,79	0,00	0,00
Q	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	5,26	5,26	5,26	7,89	0,00
R	7,89	2,63	2,63	5,26	5,26	5,26	2,63	7,89	15,79	5,26
S	2,63	2,63	7,89	5,26	13,16	5,26	10,53	0,00	7,89	0,00
T	5,26	2,63	5,26	7,89	2,63	2,63	5,26	5,26	10,53	13,16
V	18,42	21,05	7,89	5,26	2,63	7,89	7,89	5,26	10,53	5,26
W	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	0,00	0,00
Y	2,63	0,00	0,00	0,00	2,63	2,63	0,00	0,00	0,00	13,16
Gruppen										
DE	7,89	10,53	15,79	10,53	21,05	23,68	7,89	15,79	5,26	0,00
RHK	10,53	15,79	15,79	21,05	7,89	18,42	21,05	15,79	31,58	10,53
FWY	15,79	5,26	2,63	2,63	2,63	2,63	5,26	0,00	0,00	26,32
AST	18,42	21,05	28,95	21,05	31,58	21,05	15,79	13,16	21,05	18,42
AST+V	36,84	42,11	36,84	26,32	34,21	28,95	23,68	18,42	31,58	23,68
ILV	31,58	28,95	18,42	15,79	5,26	15,79	23,68	18,42	23,68	44,74

Abbildung 24: Häufigkeiten der Aminosäuren an Positionen innerhalb der Sequenzen der gebiasteten Octamere, Nonamere und Decamere der ausgewählten Peptide aller drei Experimente.

Für alle Peptide einer Länge wird die Häufigkeit der Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen angegeben. Aminosäuren mit einer Häufigkeit von 10–40 % sind hellgelb unterlegt. Jeweils im linken unteren Spaltenbereich wurde jeweils eine Einteilung der Aminosäuren nach physikalisch-chemischen Eigenschaften in Aminosäuregruppen vorgenommen. In hellgelb sind hier Aminosäuregruppen mit einer Häufigkeit von 30–50 % an den unterschiedlichen Sequenzpositionen markiert.

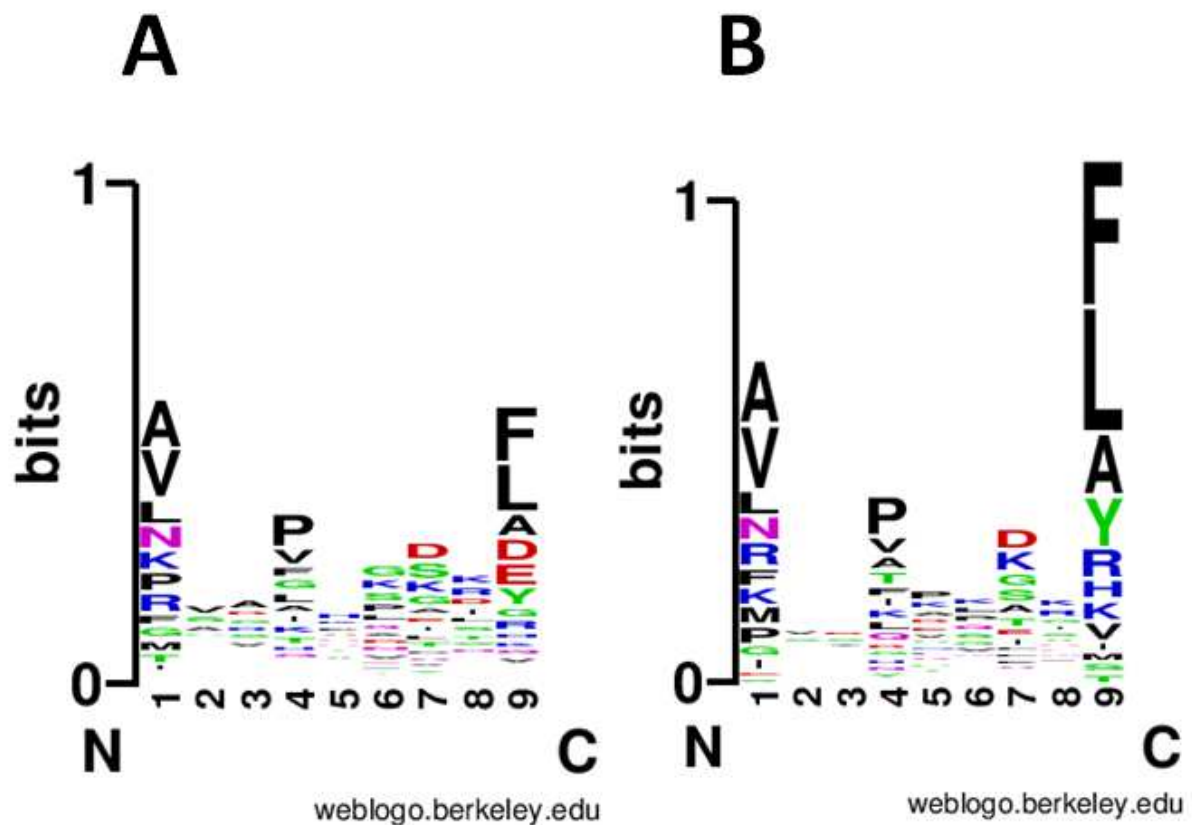


Abbildung 25: Vermutliches Bindemotiv für das Allel DLA-88\*03201. Dargestellt sind die Häufigkeiten der Aminosäuren an verschiedenen Sequenzpositionen der ausgewählten Nonamere aller drei DLA-88\*03201-Experimente.

(A) Verwendung nicht gebiaster Nonamere

(B) Verwendung gebiaster Nonamere

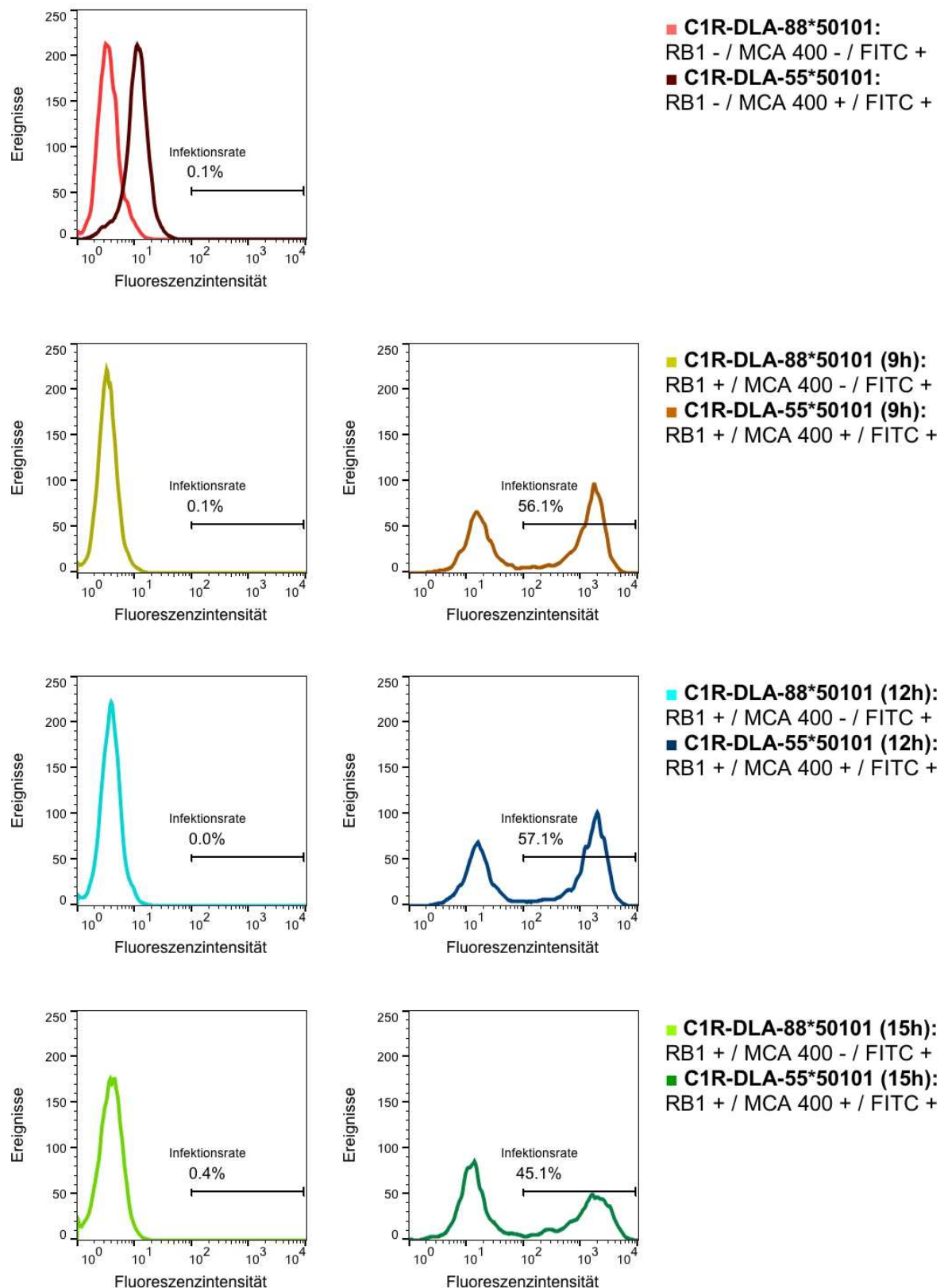
Die Größe der Buchstaben korreliert jeweils mit der Häufigkeit einer Aminosäure an einer bestimmten Stelle. Je größer der Buchstaben ist, desto frequenter tritt eine Aminosäure auf.

Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) erstellt.

## **4.2 Teil 2.1: Isolation viraler und zellulärer DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Liganden**

### **4.2.1 Bestimmung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen**

Vor der eigentlichen Isolation von viralen DLA-88\*50101-Liganden musste als erster Schritt die Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen mittels intrazellulärer FACS-Färbung bestimmt werden. Hierbei sollte nicht nur herausgefunden werden, ob eine Infektion von C1R-DLA-88\*50101 möglich ist, sondern gleichzeitig im Falle eines positiven Ergebnisses festgestellt werden, nach welcher Inkubationszeit die Infektionsrate der Zellen am höchsten war. Aus diesem Grund wurden mehrere Ansätze verwendet, die nach Infektion mit dem Influenzavirus entweder für 9, 12 oder 15 Stunden inkubiert wurden, bevor die Zellen fixiert und permeabilisiert wurden. Vorgegangen wurde wie unter 3.2.2.3.1 beschrieben. Als Primärantikörper wurde der MCA-400-Antikörper verwendet, mit dem Influenza-A-Nukleoproteine nachgewiesen werden können, als Sekundärantikörper kam ein FITC-konjugierter Antikörper zum Einsatz. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wurde für jedes Zeitintervall zusätzlich jeweils ein Ansatz ohne Primärantikörper ausgewertet. Zur Kontrolle wurden nicht infizierte C1R-DLA-88\*50101-Zellen verwendet, die mit und ohne Primärantikörper inkubiert wurden. In Abbildung 26 sieht man die Histogramme der verschiedenen Ansätze nach intrazellulärer FACS-Färbung und Auswertung mittels eines FACSCalibur-Zytometers sowie des Programms FloJo 10.0.7. Die Fluoreszenzintensität nicht infizierter C1R-DLA-88\*50101-Zellen nach Inkubation ohne Primärantikörper (in hellrot) zeigte hierbei einen Fluoreszenzpeak bei 2, die Fluoreszenzintensität nicht infizierter C1R-DLA-88\*50101-Zellen nach Inkubation mit Primärantikörper (in dunkelrot) einen Fluoreszenzpeak bei 15. Somit wurde ein geringer Grad an unspezifischer Bindung des Primär- sowie des Sekundärantikörpers an den nicht infizierten Zellen deutlich. Für die Infektionsansätze nach 9, 12 und 15 Stunden ohne Verwendung des Primärantikörpers zeigte sich, äquivalent zu der Negativkontrolle ohne Primärantikörper, dieselbe niedrige Fluoreszenzintensität (dargestellt in hellbraun, -blau und -grün) und somit dieselbe niedrige unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers.



**Abbildung 26: Histogramme zur Bestimmung der Infektionsrate von C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit dem Influenzavirus RB1.**

Rottöne stellen die Fluoreszenzintensität der Negativkontrollen dar. Braun-, Blau- und Grüntöne zeigen die Fluoreszenzintensität der Infektionsansätze jeweils mit und ohne Verwendung des Primäntikörpers

MCA-400, nach 9-, 12- und 15-stündiger Inkubationszeit. Für jeden Ansatz wurde jeweils die Infektionsrate in Prozent angegeben und der hierfür berücksichtigte Bereich markiert. Bei der Bestimmung der Infektionsrate wurde jeweils die voraussichtliche unspezifische Bindung des Primärantikörpers nicht berücksichtigt (dargestellt in dunkelrot).

Die Infektionsansätze, die mit Primärantikörper inkubiert wurden, sind in dunkelbraun, -blau und -grün dargestellt und zeigen jeweils zwei Teilpopulationen. Vergleicht man weitergehend jeweils die Fluoreszenzpeaks der Teilpopulationen mit niedriger Fluoreszenzintensität mit den Fluoreszenzpeaks der Kontrollen mit Primärantikörper, wird augenscheinlich, dass beide im gleichen Bereich angesiedelt sind und somit wahrscheinlich durch die unspezifische Bindung des Primärantikörpers zustande kamen. Weitergehend wurde die Infektionsrate der verschiedenen Ansätze jeweils durch das Setzen eines Gates bestimmt. Hierbei wurden Fluoreszenzintensitäten unterhalb eines Wertes von hundert für jeden Ansatz von der Beurteilung ausgeschlossen, um Fluoreszenzintensitäten als Folge der unspezifischen Bindung des Primärantikörpers nicht zu berücksichtigen. Als Infektionsrate wurde jeweils der Anteil der markierten Teilpopulation an der Gesamtpopulation in Prozent angegeben. Die Bestimmung der Infektionsraten ergab schließlich nach einer Inkubation von 12 Stunden den größten Wert mit 57,1 %, gefolgt von einer Infektionsrate von 56,1 % nach 9-stündiger Inkubation. Die niedrigste Infektionsrate wurde nach 15 Stunden erreicht mit 45,1 %. Somit wurden die C1R-DLA-88\*50101-Zellen in den folgenden Experimenten nach der Infektion jeweils für 12 Stunden inkubiert, um eine möglichst große Anzahl an infizierten Zellen zu erzielen.

#### 4.2.2 Ergebnisse der Virusanzucht

Vor dem Beginn der eigentlichen Experimente musste zunächst eine ausreichende Menge an Influenzaviren generiert werden. Zur Replikation des Virus wurden humane Lungenkarzinomzellen (A549-Zellen) sowie canine Hundenierenepithelzellen (MDCKII-Zellen) verwendet. Die Vorgehensweise erfolgte hierbei wie unter 3.2.2.1 beschrieben, wobei die Zellen zunächst mit einer MOI von 0,001 infiziert wurden. Nach dem Erreichen eines zytopathischen Effekts von 50 % in den Zellkulturen der adhärent wachsenden Zellen wurde der Überstand abgekippt und ultrazentrifugiert. Dann wurde eine Probe des Viruskonzentrats gezogen und der Virustiter wurde mittels Avicel Plaque Assay und dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel bestimmt. Das Viruskonzentrat wurde in der Zwischenzeit bei -80 °C gelagert, bis die

Ergebnisse der Virustitration vorlagen. Tabelle 22 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit zur Virusproduktion durchgeführten Experimente unter zusätzlicher Angabe des zugehörigen Virustiters und der generierten Menge.

**Tabelle 22: Virustiter der Viruskonzentrate und Angabe der jeweils verfügbaren Menge in Milliliter.**

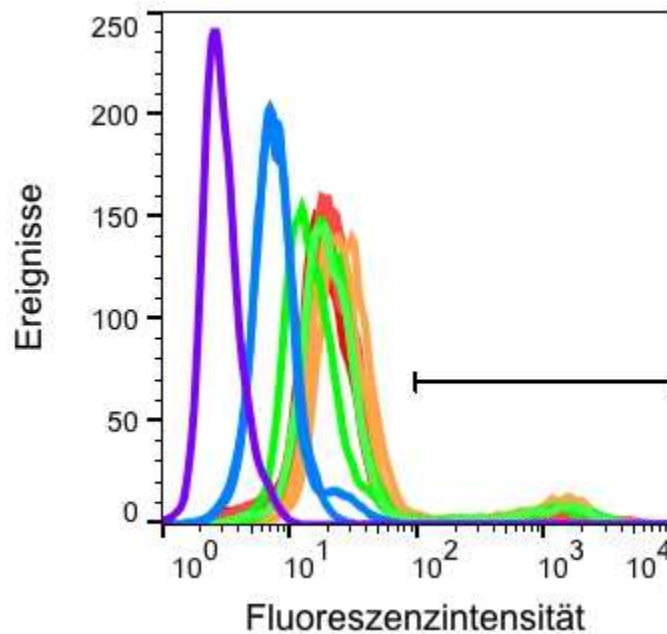
Experiment	Virustiter des Pellets (log10 FFU)	Volumen (ml)
2016-CSC-004	8,6	5
2016-CSC-007	8,4	5
2016-CSC-010	6,6	5
2016-CSC-012	7,7	5
2016-CSC-015	8,6	5
2016-CSC-017	7,7	5
2016-CSC-020	7,3	5
2016-CSC-022	7,6	5
2016-CSC-027	7,9	5
2016-CSC-032	8,1	5

#### 4.2.3 Infektion von C1R-DLA-88\*50101-Zellen ohne Trypsin

Das Protein Hämagglutinin auf der Oberfläche von Influenza-A-Viren besteht aus drei gleichen Untereinheiten, die gemeinsam als H0 bezeichnet werden. Als Grundvoraussetzung für die Infektion von Zellen muss das H0 jeweils proteolytisch in die Untereinheiten H1 und H2 gespalten worden sein. Bei hochpathogenen, aviären Influenzaviren erfolgt die Spaltung des H0 durch ubiquitär vorkommende Furin-Proteasen, wohingegen bei niedrigpathogenen Influenzaviren das H0 durch trypsinähnliche Proteasen gespalten wird [160]. Zur In-vitro-Infektion von Zellen wird in der Regel die Protease Trypsin im Zellkulturmedium verwendet, um eine effiziente H0-Spaltung zu vermitteln [143]. Die Verwendung von Trypsin bei der Infektion von Zellen mit Influenza-A-Virus hat jedoch nicht nur einen Einfluss auf das virale



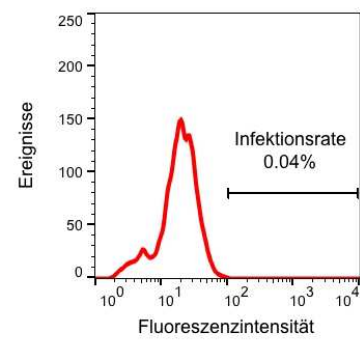
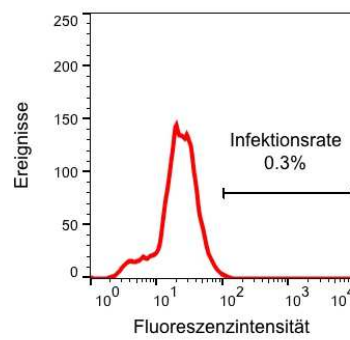
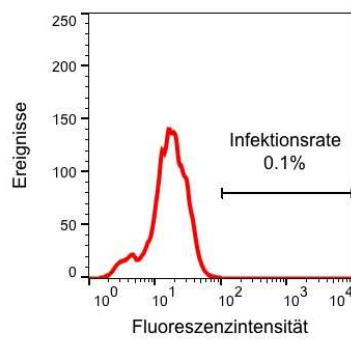
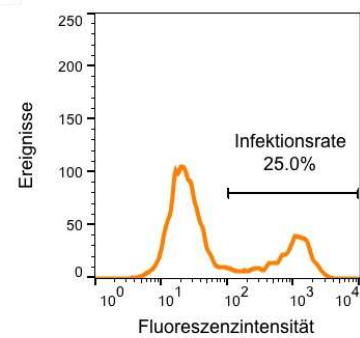
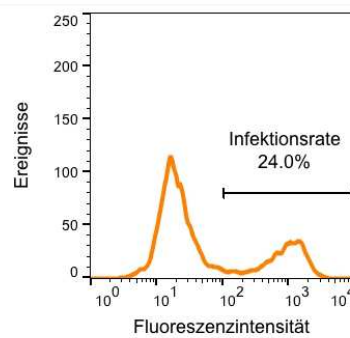
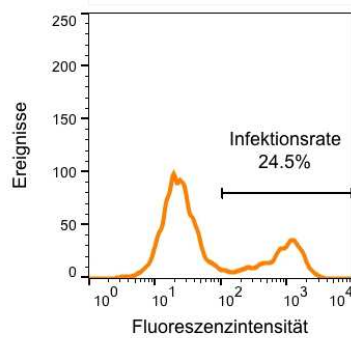
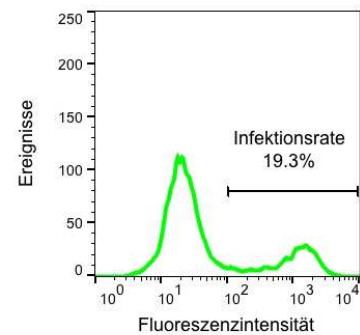
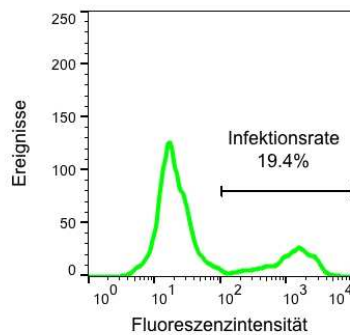
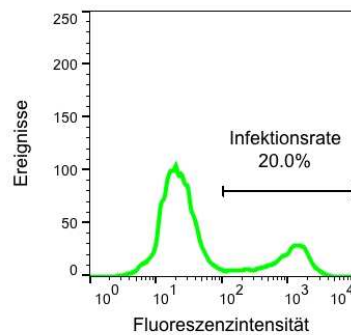
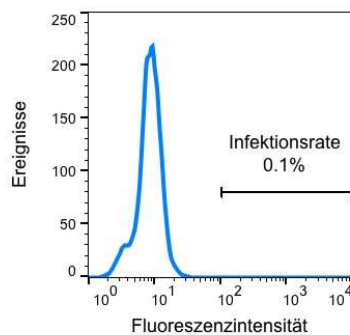
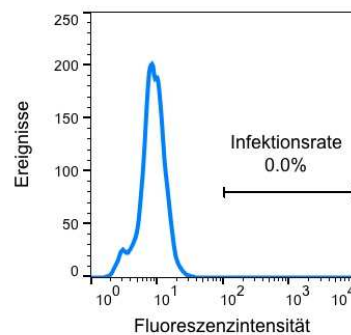
Hämagglutinin, sondern bewirkt auch, dass Proteine wie zum Beispiel MHC-Klasse-I-Komplexe auf der Zelloberfläche enzymatisch gespalten werden. Die daraus resultierende Verringerung der MHC-Klasse-I-Expression ist in der Folge mit einer niedrigeren Ausbeute an MHC-Liganden bei einer nachfolgenden Immunaффinitätschromatographie verknüpft. Da einige Zelllinien über eine endogene Proteasenexpression verfügen, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob sich C1R-DLA-88\*50101-Zellen auch ohne die Verwendung von Trypsin effizient infizieren lassen, um somit nachfolgend eine möglichst große PeptidAusbeute gewährleisten zu können. Hierzu wurde die Infektionsrate der Zellen nach Infektion mit und ohne Verwendung von Trypsin mittels intrazellulärer FACS-Färbung bestimmt. Das experimentelle Vorgehen erfolgte wie unter 3.2.2.3.1 beschrieben. Um den Bereich festzulegen, der zur Bestimmung der Infektionsrate herangezogen werden sollte, wurden die Fluoreszenzkurven der Negativkontrollen mit denen der Infektionsansätze in einem gemeinsamen Histogramm dargestellt (Abbildung 27). Als Primärantikörper wurde der Antikörper MCA-400 verwendet, der an das Influenza-A-Nukleoprotein bindet. Als Sekundärantikörper kam ein FITC-markierter Antikörper zum Einsatz. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindung des Primärantikörpers wurden Negativkontrollen mit nicht infizierten Zellen sowie Isotypkontrollen mit GAP-A3-Antikörpern verwendet. Zur Überprüfung der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wurde ein Ansatz ohne Primärantikörper inkubiert. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Kurvenverläufe wurde zunächst ersichtlich, dass die Infektionsansätze im Vergleich zu den Kontrollansätzen, wie auch schon unter 4.2.1 beschrieben, jeweils zwei Populationen aufwiesen. Hierbei zeigten die Teilpopulationen mit niedriger Fluoreszenzintensität jeweils Kurvenverläufe im selben Fluoreszenzbereich wie auch die Negativkontrollen, wodurch davon auszugehen war, dass hierbei jeweils Fluoreszenzintensitäten wiedergegeben wurden, die durch die unspezifische Bindung des Primärantikörpers zustande gekommen sind. Somit wurden im weiteren Verlauf niedrige Fluoreszenzintensitäten von der weiteren Analyse ausgeschlossen, indem nur Fluoreszenzen größer als hundert innerhalb der Histogramme markiert und zur weiteren Bestimmung der Infektionsraten herangezogen wurden.

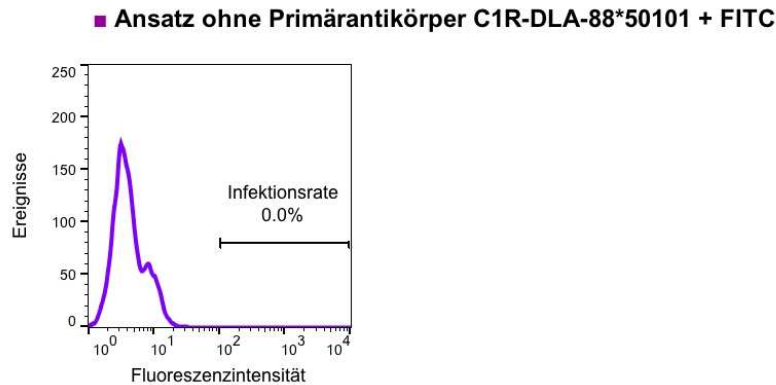


**Abbildung 27:** Festlegung des Bereichs, der für die Bestimmung der Infektionsrate relevant ist.

Die roten Kurven zeigen die Fluoreszenz der Negativkontrollen, die orangen Kurven die der Infektionsansätze unter Verwendung von Trypsin und die grünen Kurven stellen die Fluoreszenz der Infektionsansätze ohne Verwendung von Trypsin dar. Die blauen Kurven zeigen die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrollen, die lila Kurve die des Ansatzes ohne primären Antikörper. In schwarz ist der Bereich markiert, der jeweils zur Bestimmung der Infektionsrate herangezogen wurde.

Abbildung 28 zeigt die Histogramme der einzelnen Ansätze jeweils getrennt voneinander aufgelistet. Hierbei ist für jeden Ansatz jeweils der Bereich, welcher zur Bestimmung der Infektionsrate herangezogen wurde, markiert und die jeweilige Infektionsrate ist angegeben. Die Infektionsrate entspricht hierbei dem Anteil der markierten Teilpopulation an der Gesamtpopulation in Prozent. Bei genauerer Analyse der verschiedenen Fluoreszenzkurven zeigte sich jeweils wie erwünscht eine niedrige Fluoreszenzintensität für die beiden technischen Replikate der Isotypkontrollen sowie für die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers mit Fluoreszenzpeaks unterhalb von zehn. Für die drei Replikate beider Infektionsansätze konnten jeweils, wie bereits in Abbildung 26 ersichtlich wurde, zwei Teilpopulationen beobachtet werden. Nachfolgend wurden, wie oben bereits beschrieben, nur die Bereiche mit Fluoreszenzintensitäten oberhalb von hundert zur weiteren Bestimmung der Infektionsrate herangezogen.

**■ Negativkontrolle C1R-DLA-88\*50101 + MCA 400 + FITC****■ Infektion ohne Trypsin C1R-DLA-88\*50101 + MCA 400 + FITC****■ Infektion mit Trypsin C1R-DLA-88\*50101 + MCA 400 + FITC****■ Isotypenkontrolle C1R-DLA-88\*50101 + GAP A3 + FITC**



**Abbildung 28:** Histogramme zur Überprüfung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit dem Influenzavirus RB1 ohne Verwendung von Trypsin.

Die roten Kurven zeigen jeweils die Fluoreszenzintensität der Negativkontrollen, die orangen Kurven die der Infektionsansätze ohne Verwendung von Trypsin bei der Inkubation, die grünen Kurven die Fluoreszenzintensität der Infektionsansätze nach Verwendung von Trypsin bei der Inkubation. Als Primärantikörper wurde der Antikörper MCA-400 verwendet, als Sekundärantikörper ein FITC-markierter Antikörper. Die blauen Kurven zeigen die Isotypkontrollen mit GAP-A3-Primärantikörper und Sekundärantikörper, die lila Kurve die Isotypenkontrolle unter ausschließlicher Verwendung von Sekundärantikörpern. Für jeden Ansatz wurde jeweils die Infektionsrate in Prozent bestimmt und der hierfür berücksichtigte Bereich markiert (schwarz).

Hierbei zeigte sich wie zu erwarten eine Infektionsrate von 0 % für die Negativkontrollen, die Isotypkontrollen und den Ansatz ohne Primärantikörper. Des Weiteren konnten höhere Infektionsraten bei den Infektionsansätzen ohne Trypsin erzielt werden als bei den Infektionsansätzen mit Trypsin. Insgesamt wurde dieser Versuch zweimal durchgeführt. Tabelle 23 gibt jeweils einen Überblick über die Mittelwerte der Infektionsraten beider Versuche, bestimmt aus den technischen Replikaten der Infektionsansätze mit zugehöriger Standardabweichung. Es wird ersichtlich, dass sich das vorherige Bild auch im zweiten Versuch bestätigte und somit beide Experimente eine höhere Infektionsrate ohne Verwendung von Trypsin während der Inkubation aufwiesen. Somit konnte im weiteren Verlauf die Infektion der C1R-DLA-88\*50101-Zellen für die nachfolgende Immunaффinitätschromatographie ohne die Verwendung von Trypsin im Inkubationsmedium erfolgen, wodurch eine möglichst große Menge an viralen MHC-Liganden bei der Immunaффinitätschromatographie garantiert werden sollte.

**Tabelle 23: Übersicht über die Mittelwerte der Infektionsraten aus drei technischen Replikaten pro Experiment mit zugehöriger Standardabweichung.**

<b>Experiment 1</b>		
<b>Ansatz</b>	<b>Infektionsrate</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Infektion mit Trypsin</b>	19,6	0,4
<b>Infektion ohne Trypsin</b>	24,5	0,5
<b>Experiment 2</b>		
<b>Ansatz</b>	<b>Infektionsrate</b>	<b>Standardabweichung</b>
<b>Infektion mit Trypsin</b>	8,7	0,2
<b>Infektion ohne Trypsin</b>	11,0	0,7

#### **4.2.4 Isolation viraler und zellulärer DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Liganden**

Zur Isolation von viralen und zellulären DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Liganden wurden C1R-DLA-88\*50101-, C1R-HLA-A\*02:01- sowie JY-Zellen vorbereitet, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, wobei die Infektionsansätze jeweils ohne die Verwendung von Trypsin im Inkubationsmedium infiziert und anschließend für 12 Stunden inkubiert wurden. Darauf folgend wurden die vorbereiteten Zelllysate jeweils zyklisch durch Chromatographie-Säulen geleitet und der Antikörper BBM.1 verwendet, um MHC-Moleküle zu isolieren. Mit Hilfe eines sauren Lösungsmittels konnten die Peptidliganden dann von den MHC-Molekülen eluiert und mittels Ultrafiltration separiert werden. Nach weiterer Konzentration und Aufreinigung der Proben erfolgte eine Analyse der Peptide mittels eines LTQ-Orbitrap-XL-Hybridmassenspektrometers. Auf Grund der nur einmaligen Durchführung einer Immunaффinitätschromatographie mit infizierten JY-Zellen wurde in diesem Fall ein Orbitrap-Fusion Lumos-Massenspektrometer mit höherer Sensitivität verwendet, um eine ausreichende Peptidausbeute zu gewährleisten. Zur Analyse der MS-Daten wurde jeweils das Programm Proteome Discoverer 1.4 verwendet, das die Rohdaten des Massenspektrometers an die Suchmaschine Sequest weiterleitete.

**Tabelle 24:** Vergleichende Darstellung der identifizierten Peptide nach Isolierung mittels MHC-Immunaффinitätschromatographie (Experiment mit nicht infizierten Zellen).

Experiment	Art der Infektion	Zellart	Zellzahl	Gesamtpeptidzahl
1	-	C1R-DLA-88*50101	$1 \times 10^9$	497
2	-	C1R-DLA-88*50101	$1 \times 10^9$	1 206
3	-	C1R-DLA-88*50101	$1 \times 10^9$	1 316
4	-	C1R-HLA-A*02:01	$5 \times 10^9$	1 414
5	-	C1R-HLA-A*02:01	$5 \times 10^9$	1 150

**Tabelle 25:** Vergleichende Darstellung der identifizierten Peptide nach Isolierung mittels MHC-Immunaффinitätschromatographie (Experiment mit infizierten Zellen).

Experiment	Art der Infektion	Zellart	Zellzahl	Gesamtpeptidzahl
1	Influenzavirus	C1R-DLA-88*50101	$1 \times 10^9$	1 220
2	Influenzavirus	C1R-DLA-88*50101	$1 \times 10^9$	1 150
3	Influenzavirus	C1R-DLA-88*50101	$1 \times 10^9$	1 352
4	Influenzavirus	JY	$5 \times 10^9$	8 850

Anschließend wurden mit Hilfe der Datenbank Swissprot die Fragmentspektren annotiert, wobei für die Infektionsansätze jeweils zusätzlich die Aminosäuresequenzen des Influenzavirus A/Regensburg/D6/2009 (H1N1) der NCBI-Nukleotiddatenbank ergänzt worden waren. Tabelle 24 gibt einen Überblick über die Menge an Peptiden, die pro Experiment mit nicht infizierten Zellen identifiziert werden konnten, gemeinsam mit den hierfür jeweils eingesetzten Zellzahlen. Tabelle 25 liefert dieselben Informationen für die Experimente mit infizierten Zellen. Die verwendeten C1R-DLA-88\*50101- und C1R-HLA-A\*02:01-Zellen wiesen neben den zu bestimmenden DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Peptiden jeweils auch eine natürli-

che Co-Expression von HLA-B\*35:03- und HLA-C\*04:01-Peptiden auf ihrer Oberfläche auf. Ebenso exprimierten die verwendeten JY-Zellen nicht nur die für die weiteren Analysen interessanten HLA-A\*02:01-Peptide, sondern auch zusätzlich HLA-B\*07:02- und C\*07:02-Peptide. Aus diesem Grund wurde jeweils für jedes Experiment der Anteil an nicht relevanten Peptiden, wie unter 3.2.3.3.5 und 3.2.3.3.6 beschrieben, bestimmt und jeweils von der Gesamtpeptidzahl abgezogen. Tabelle 26 gibt einen Überblick über den prozentualen Anteil der mittels des Vorhersageprogramms Ligandosphere bestimmten HLA-Liganden an der Gesamtzahl an gefundenen Peptiden der Experimente mit nicht infizierten Zellen. Tabelle 27 liefert dieselben Informationen für die Experimente mit infizierten Zellen. Barth et al., 2016, PLoS ONE hatten vorausgehend das Bindemotiv für das canine Allel DLA-88\*50101 charakterisiert und dabei eine große Ähnlichkeit der Bindemotive von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 festgestellt. Somit sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob ein ähnliches Bindemotiv in diesem Fall auch mit einer großen Übereinstimmung der präsentierten Peptidliganden einherging.

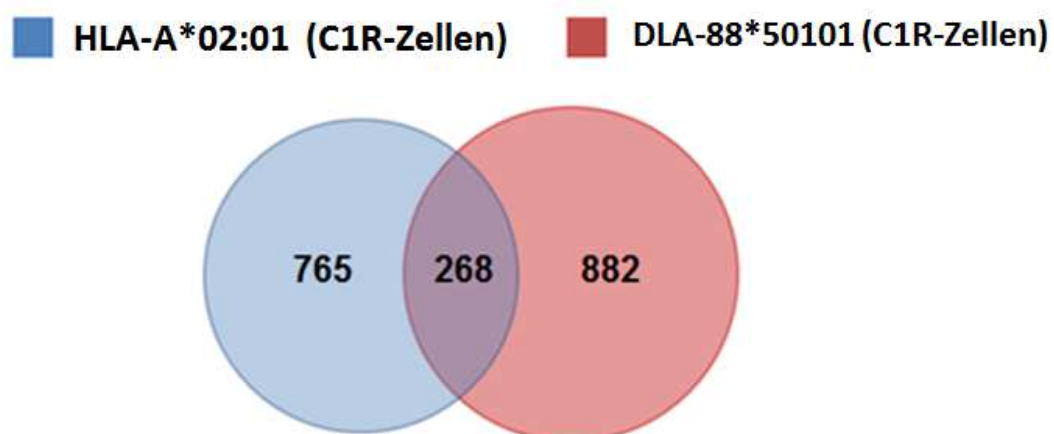
**Tabelle 26: Übersicht über die HLA-assoziierten und vermutlich DLA-assoziierten Peptide pro Experiment mit nicht infizierten Zellen.**

Experiment	Zellart	Gesamt-peptidzahl	% HLA-A*02:01	% HLA-B*35:03	% HLA-C*04:01	% DLA-88*50101
1	C1R-DLA-88*50101	497	-	0,4	8,2	91,3
2	C1R-DLA-88*50101	1206	-	0,7	7,6	91,8
3	C1R-DLA-88*50101	1316	-	0,7	14,3	85,1
4	C1R-HLA-A*02:01	1414	79,6	0,6	15,3	-
5	C1R-HLA-A*02:01	1150	80,3	0,4	13,9	-

**Tabelle 27: Übersicht über die HLA-assoziierten und vermutlich DLA-assoziierten Peptide pro Experiment mit infizierten Zellen.**

Experiment	Zellart	% HLA-A*02:01	% HLA-B*35:03	% HLA-C*04:01	% DLA-88*50101	% HLA-B*07:02	% HLA-C*07:02
1	C1R-DLA-88*50101	-	0,6	7,7	91,3	-	-
2	C1R-DLA-88*50101	-	0,8	8,0	91,8	-	-
3	C1R-DLA-88*50101	-	0,7	11,7	85,1	-	-
4	JY	48,6	-	-		43,2	8,1

Hierfür wurde in der Folge das Ligandom von C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit dem von C1R-HLA-A\*02:01 verglichen. Verwendung fanden jeweils zehn HLA-Proben aus zwei biologischen Replikaten sowie sieben DLA-Proben aus drei biologischen Replikaten. Peptide, die von HLA-A\*02:01 präsentiert wurden, konnten hierbei jeweils 1 033 Quellproteine zugeordnet werden, wobei 765 Quellproteine (74,1 %) ausschließlich von HLA-A\*02:01 stammten (Abbildung 29).

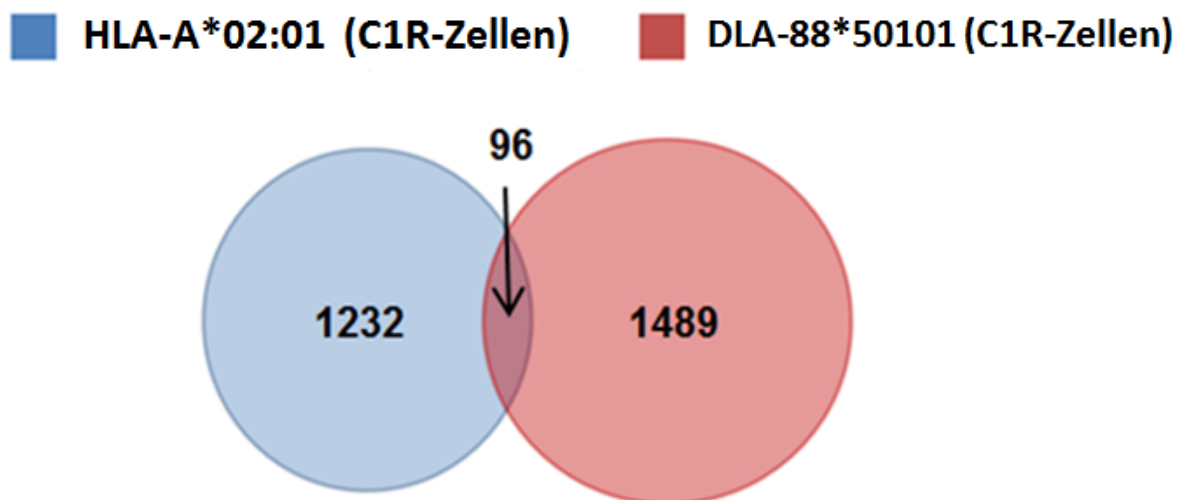


**Abbildung 29: Vergleich der Quellproteine der MHC-Klasse-I-Liganden von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01.**

Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms <http://www.biovenn.nl> erstellt.



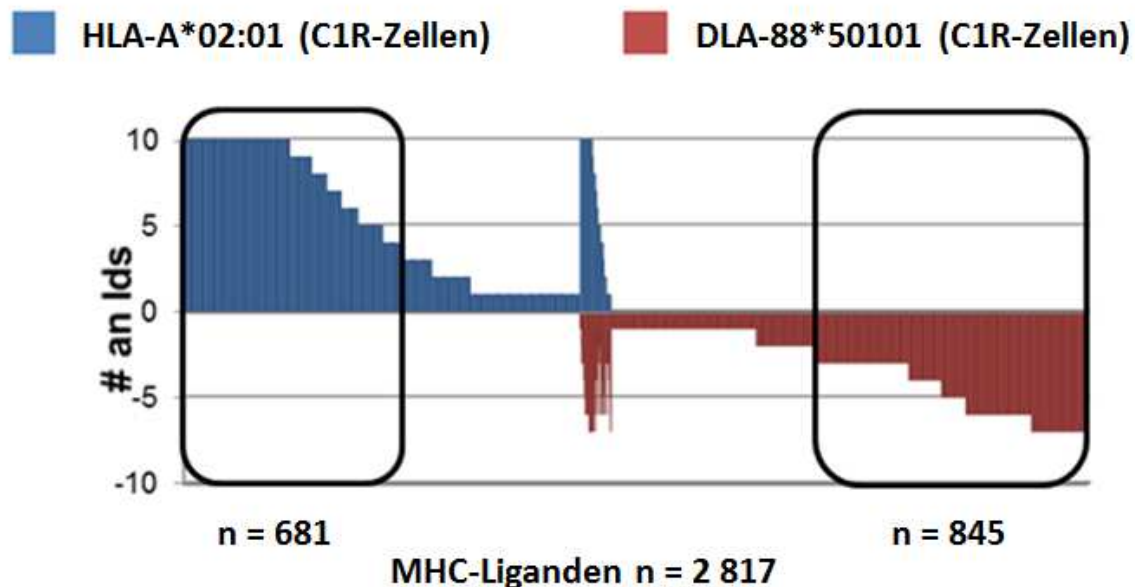
Peptide, die von DLA-88\*50101 ausgingen, wurden 1 150 Quellproteinen zugeordnet, wobei 882 Quellproteine (76,7 %) ausschließlich zu DLA-88\*50101 zugehörig waren. Bei Betrachtung der Gesamtheit aller bestimmten Quellproteine konnten 268 Proteine sowohl DLA-88\*50101 (23,3 %) als auch HLA-A\*02:01 (25,9 %) zugeordnet werden. Weitergehend wurde die Zusammensetzung der identifizierten DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Peptide miteinander verglichen (Tabelle 24; Abbildung 30). Die Probenanalyse der Experimente mit C1R-HLA-A\*02:01-Zellen lieferte 2 564 identifizierte Peptide. Hiervon stammten 391 Peptide von HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01 (15,2 %) sowie 2049 Peptide von HLA-A\*02:01 (79,9 %). Die Experimente mit C1R-DLA-88\*50101-Zellen ergaben 3 019 Peptide, 340 (11,2 %) von HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01, außerdem 2 681 (88,8 %) von DLA-88\*50101. Die Schnittmenge der C1R-DLA-88\*50101- und C1R-HLA-A\*02:01-Peptide umfasste 96 Peptide (3,4 %). Die Kontrolle technischer Schwankungen der Peptidanalysen mittels LC/MS-System erfolgte dann mittels Darstellung in einem Waterfall Plot (Abbildung 31). Hierbei wurde jeweils das Auftreten der Peptide während der verschiedenen Läufe für die zwei unterschiedlichen MHC-Klasse-I-Moleküle veranschaulicht und der Schwellenwert für signifikante Peptide, die entweder durch HLA oder DLA präsentiert wurden, mittels randomisierter Analyse bestimmt.



**Abbildung 30:** Vergleich der MHC-Klasse-I-präsentierten Peptide von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01.

Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms <http://www.biovenn.nl> erstellt.

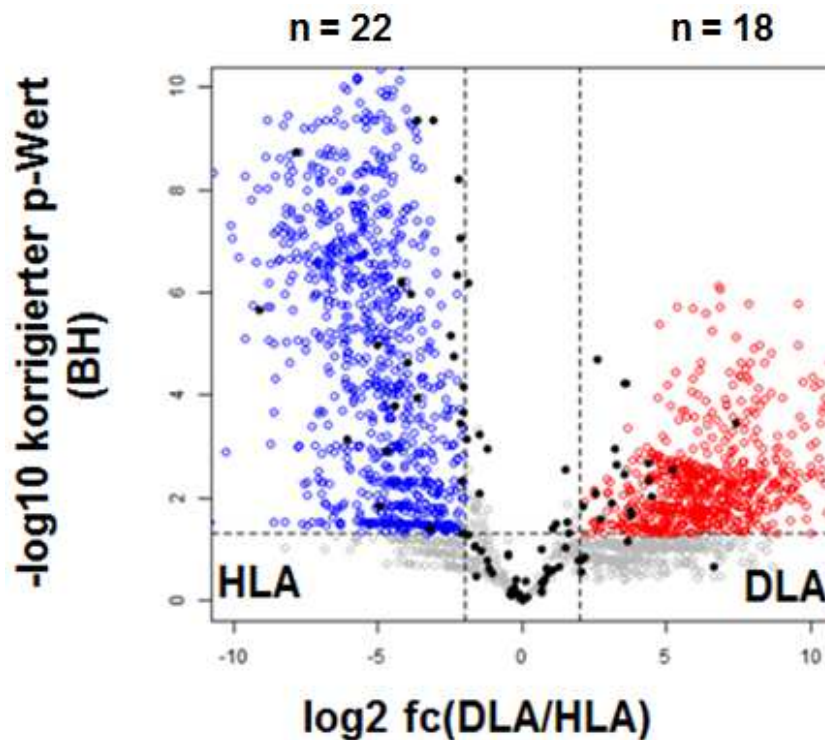
Es zeigte sich, dass 681 der 1 232 Liganden (24,2 % des gesamten HLA-/DLA-Ligandoms), die nur auf HLA-A\*02:01-MHC-Molekülen präsentiert wurden, signifikant mit C1R-HLA-A\*02:01-Zellen assoziiert waren. Wohingegen von den 1 489 DLA-Liganden, die ausschließlich auf DLA-88\*50101-MHC-Molekülen präsentiert wurden, 845 signifikante Peptide mit C1R-DLA-88\*50101-Zellen assoziiert waren (30,0 % des gesamten HLA-/DLA-Ligandoms).



**Abbildung 31:** Vergleichende Analyse der Peptidfrequenzen von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01.

Auf der x-Achse sind die jeweiligen Peptidliganden aufgetragen, auf der y-Achse ist deren Auftreten während der verschiedenen massenspektrometrischen Läufe angegeben. Die schwarzen Boxen stellen die Menge an signifikanten Peptiden unter den Liganden dar, die entweder auf DLA-88\*50101 oder HLA-A\*02:01 präsentiert werden, wobei die Anzahl an signifikanten Peptiden jeweils unterhalb der Boxen angegeben ist.

Des Weiteren wurden die Abundanzen der Liganden, die auf HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 präsentiert wurden, mittels Volcano Plot miteinander verglichen (Abbildung 32). Hierbei sind Liganden mit einem Signifikanzlevel von  $p < 0,05$  nach Benjamini-Hochberg-Korrektur und einem Fold Change  $> 4$  für DLA-88\*50101 in rot dargestellt oder für HLA-A\*02:01 in blau. Peptide, die sowohl auf HLA als auch auf DLA präsentiert wurden, sind schwarz markiert. Es wird ersichtlich, dass 40 der 96 Peptide, die auf HLA und DLA präsentiert wurden, jeweils oberhalb des Signifikanzlevels lagen. Dies entspricht 1,4 % des gesamten HLA-/DLA-Ligandoms.



**Abbildung 32:** Vergleichende Darstellung der Abundanzen der DLA-88\*50101- und HLA-A\*02:01-Liganden.

Jeder Punkt repräsentiert einen spezifischen Liganden. Die y-Achse zeigt das Signifikanzlevel nach Benjamini-Hochberg-Korrektur, die x-Achse stellt den Log2-fold Change der Abundanzen dar. Peptide mit einem p-Wert  $< 0,05$  und Fold Change  $> 4$  sind in rot beziehungsweise blau dargestellt. Die Peptide, die auf HLA und DLA präsentiert wurden, sind schwarz markiert. Die Anzahl an signifikanten Peptiden unter den überlappenden Peptiden ist oberhalb der zugehörigen Quadranten angegeben.

Nach vergleichender Betrachtung der Peptide von HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 aus Quellproteinen humanen Ursprungs sollten nun weitergehend Peptide von Quellproteinen viralen Ursprungs genauer analysiert werden. Hierfür wurden virale Peptide, die von C1R-DLA-88\*50101-Zellen eluiert wurden, mit viralen Peptiden des HLA-A\*02:01 von JY-Zellen verglichen. Es wurden in diesem Fall JY-Zellen verwendet, weil sie eine relativ hohe MHC-Expression aufweisen. Insgesamt wurden 3 354 DLA-88\*50101-Peptide in sieben Läufen (drei biologische Replikate) identifiziert sowie 4 786 HLA-A\*02:01-Peptide in drei Läufen eines Experiments (Tabelle 26). Für DLA-88\*50101 konnten 8 virale Peptide identifiziert werden, diese sind in Tabelle 28 dargestellt unter zusätzlicher Angabe des jeweils zugrunde liegenden Influenzaquellproteins. Jede identifizierte Peptidsequenz wurde zusätzlich hinsicht-

lich ihrer Bindungsaffinität gegenüber DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 untersucht, wofür die Epitopvorhersageprogramme SYFPEITHI@home sowie NetMHCpan 3.0 verwendet wurden. Die jeweils erzielten SYFPEITHI@home-Scores als Prozentsatz der erreichten Werte am maximal möglichen Wert sowie der NetMHCpan 3.0-%-Rank sind zusätzlich in Tabelle 28 angegeben. Zwei Peptide zeigten hierbei einen hohen SYFPEITHI-Score für DLA-88\*50101 mit über 80 % des maximal erreichbaren Wertes, ein Peptid einen niedrigen Score mit 36,7 % und für 3 Peptide konnte kein Wert berechnet werden.

**Tabelle 28: MHC-Klasse-I-Peptide (DLA-88\*50101) aus Influenza-spezifischen Proteinen (MHC-Präzipitation mit C1R-DLA-88\*50101-Zellen).**

Influenza-Peptid-Sequenz	Quellprotein	UniProt KB IB	Position	SYFPEITHI-Score HLA-A*02:01	% of maximal possible SYFPEITHI-HLA-Score*	SYFPEITHI-Score DLA-88*50101	% of maximal possible SYFPEITHI-DLA-Score*	%-rank HLA-A*02:01
				SYFPEITHI@home	SYFPEITHI@home	SYFPEITHI@home	SYFPEITHI@home	NetMHCpan
<b>KVNSVIEKM</b>	Hämagglutinin	C6H0I3-1	395–403	16	44,4	17	56,7	12,0
<b>NDKGKEVL</b>	Hämagglutinin	C6H0I3-1	184–191	n. a.	-	n. a.	-	95,0
<b>YINDKGKEV</b>	Hämagglutinin	C6H0I3-1	182–190	24	66,7	24	80,0	4,5
<b>YINDKGKEVL</b>	Hämagglutinin	C6H0I3-1	182–191	22	64,7	25	86,2	13,0
<b>IIGPLCVRL</b>	Non-structural protein 1	C6H0I9-1	111–119	25	69,4	22	73,3	3,0
<b>MVTRFESL</b>	Nuclear export protein	C6H0I8-1	31–38	n. a.	-	n. a.	-	23,0
<b>TVMRMGDLHYL</b>	Nuclear export protein	C6H0I8-1	48–55	n. a.	-	n. a.	-	1,2
<b>VVFPNEVGA</b>	Polymerase basic protein	C6H0J2-1	166–174	15	41,7	11	36,7	5,5

\*Prozentsatz der erreichten Werte am maximal möglichen Wert (HLA: 9mer 36; 10mer 34; DLA: 9mer 30; 10mer 29).

Die Elution von viralen Liganden vom HLA-A\*02:01 der JY-Zellen ergab 6 Peptide, die nachfolgend in Tabelle 29 aufgelistet sind. Hierbei zeigten vier Peptide einen SYFPEITHI-Score für DLA-88\*50101 von > 60 % des maximal erreichbaren Scores. Vergleich man die viralen Peptide, die von DLA-88\*50101 eluiert wurden, mit denen von HLA-A\*02:01, zeigte sich, dass keine gleichen Peptidsequenzen gefunden wurden (Tabelle 28 und 29).

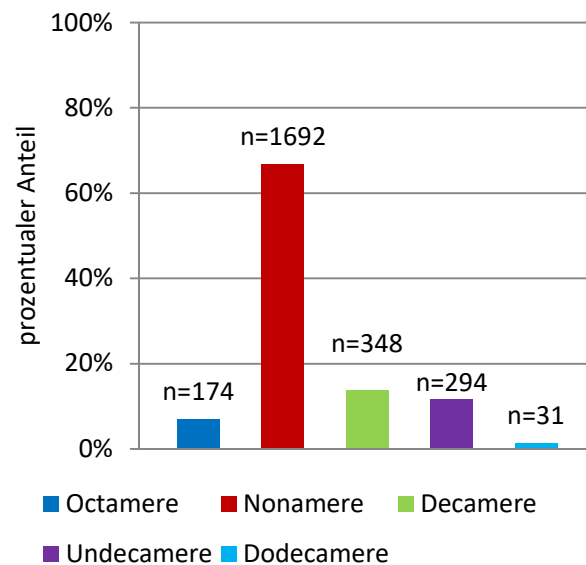
**Tabelle 29: MHC-Klasse-I-Peptide (HLA-A\*02:01) aus Influenza-spezifischen Proteinen (MHC-Präzipitation mit JY-Zellen).**

Influenza-Peptid-Sequenz	Quellprotein	UniProt KB IB	Position	SYFPEITHI-Score HLA-A*02:01	% of maximal possible SYFPEITHI-HLA-Score*	SYFPEITHI-Score DLA-88*50101	% of maximal possible SYFPEITHI-DLA-Score*	%-rank HLA-A*02:01
				SYFPEITHI @home	SYFPEITHI @home	SYFPEITHI @home	SYFPEITHI @home	Net_MHCpan
<b>RLATGLRNV</b>	Hämagglutinin	C6H0I3-1	330–338	28	77,8	19	63,3	0,6
<b>GILGFVFTL</b>	Matrix protein 1	C6H0I6-1	58–66	30	83,3	21	70,0	0,2
<b>AMMDQVRES</b>	Nucleoprotein	C6H0I7-1	237–245	18	50,0	3	10,0	3,0
<b>IMDSNTLEL</b>	Nucleoprotein	C6H0I7-1	373–381	25	69,4	11	36,7	0,3
<b>AIMEKNIVL</b>	Non-structural protein 1	C6H0I9-1	122–130	24	66,7	22	73,3	1,6
<b>ILKEESSETL</b>	Non-structural protein 1	C6H0I9-1	68–77	25	73,5	22	75,9	4,5

\* Prozentsatz der erreichten Werte am maximal möglichen Wert (HLA: 9mer 36; 10mer 34; DLA: 9mer 30; 10mer 29).

### 4.3 Bestätigung des Bindemotives für DLA-88\*50101

Weitergehend wurden die zellulären Peptide, die DLA-88\*50101 zugeordnet werden konnten, dazu verwendet, um das MHC-Klasse-I-Bindemotiv von DLA-88\*50101 zu bestimmen. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob das vermutliche Bindemotiv, dass Barth et al. [128] bereits für DLA-88\*50101 charakterisiert hatten, bestätigt werden konnte. Hierfür wurden die identifizierten DLA-88\*50101-Peptide aus den Experimenten mit nicht infizierten Zellen (Tabelle 24) mit Hilfe des Programms Motiffinder weiter untersucht. Abbildung 33 zeigt die Längenverteilung der DLA-88\*50101-Peptide, die in den Experimenten mit nicht infizierten C1R-DLA-88\*50101-Zellen gefunden wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Mehrheit der Peptide, wie zu erwarten, eine Länge von 9 Aminosäuren aufwies.



**Abbildung 33: Längenverteilung aller DLA-88\*50101-Peptide aus den MHC-Immunpräzipitationen mit nicht infizierten C1R-DLA-88\*50101-Zellen.**

Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Peptidlängen aufgetragen und auf der y-Achse ist jeweils deren prozentualer Anteil an der Gesamtpeptidzahl angegeben. Für jede Peptidlänge ist zusätzlich jeweils die absolute Peptidzahl aufgeführt.

Weitergehend wurde die Häufigkeit des Auftretens bestimmter Aminosäuren an Stellen innerhalb der gefundenen Peptidsequenzen ermittelt und die prozentuale Verteilung der Aminosäuren an den unterschiedlichen Sequenzpositionen angegeben (Abbildung 34 A). Für die Analyse wurden die isolierten Nonamere herangezogen, da diese, wie vorausgehend in Abbildung 33 ersichtlich, den größten Anteil an isolierten Peptiden darstellten. Die Betrachtung der einzelnen Aminosäuren zeigte eine Dominanz der aliphatischen und hydrophoben Aminosäuren Isoleucin (I = 46,99 %), Leucin (L = 11,78 %) und Valin (V = 31,78 %) an Position 2. Außerdem war eine Dominanz der aliphatischen und hydrophoben Aminosäuren Leucin (L = 58,04 %) und Valin (V = 19,39 %) am C-Terminus ersichtlich (Abbildung 33 A).

**A**

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amino Säure									
A	4,29	2,45	21,84	5,52	4,91	2,82	5,52	6,87	1,72
C	0,25	0,12	0,00	0,12	0,25	0,49	0,49	1,10	0,00
D	0,49	0,00	0,00	15,34	4,91	0,49	8,47	0,61	0,25
E	0,86	0,37	0,12	18,16	4,17	3,80	28,96	11,29	0,00
F	12,76	0,49	6,50	0,86	11,41	26,75	1,10	3,80	4,91
G	2,45	0,49	1,96	7,98	7,36	2,70	0,61	7,36	0,12
H	3,80	0,12	3,44	1,47	3,31	2,33	7,73	2,58	0,00
I	10,80	46,99	7,12	1,96	17,67	15,46	4,17	0,37	7,12
K	13,01	0,25	12,27	11,04	6,63	6,38	2,82	16,32	0,25
L	7,36	11,78	0,86	1,72	11,04	9,20	2,70	6,38	58,04
M	4,54	0,49	2,45	0,49	3,07	1,72	0,61	1,35	4,17
N	1,10	0,12	21,60	3,19	3,19	3,93	4,05	5,28	0,12
P	1,10	2,21	0,61	7,61	1,23	1,72	1,35	0,61	0,00
Q	2,58	0,00	4,54	5,03	1,96	4,29	7,85	7,73	0,00
R	6,01	0,37	0,98	3,31	2,09	2,70	1,47	10,92	0,00
S	7,98	0,86	8,83	8,22	2,58	3,19	7,48	6,87	0,37
T	5,28	0,98	2,45	3,68	2,94	3,80	7,98	4,29	0,00
V	10,55	31,78	1,23	3,56	7,48	5,64	4,91	2,09	19,39
W	0,74	0,00	0,00	0,25	1,10	1,84	0,25	0,00	0,00
Y	4,05	0,12	3,19	0,49	2,70	0,74	1,47	4,17	3,56
Gruppen									
DE	1,35	0,37	0,12	33,50	9,08	4,29	37,42	11,90	0,25
RHK	22,82	0,74	16,69	15,83	12,02	11,41	12,02	29,82	0,25
FWY	17,55	0,61	9,69	1,60	15,21	29,33	2,82	7,98	8,47
AST	17,55	4,29	33,13	17,42	10,43	9,82	20,98	18,04	2,09
AST+V	28,10	36,07	34,36	20,98	17,91	15,46	25,89	20,12	21,47
ILV	28,71	90,55	9,20	7,24	36,20	30,31	11,78	8,83	84,54

**B**

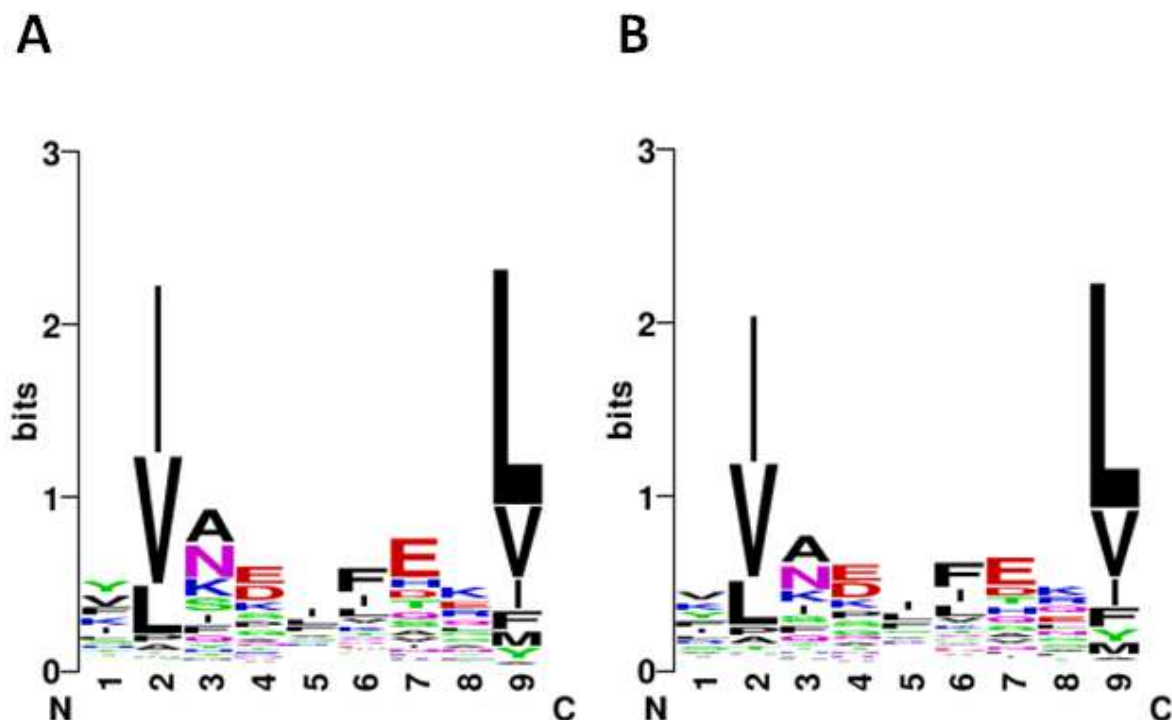
Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amino Säure									
A	5,42	2,59	21,06	5,13	4,15	3,00	5,62	5,67	1,35
C	0,08	0,08	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00
D	0,49	0,33	0,37	16,17	4,27	0,86	8,91	0,86	0,04
E	1,19	0,53	1,31	17,24	4,39	3,41	26,15	10,26	0,37
F	9,48	0,70	7,02	1,48	11,82	24,34	1,31	5,17	5,54
G	2,87	0,53	2,18	7,22	7,22	2,55	1,48	6,98	0,16
H	2,30	0,04	2,71	1,31	2,75	2,09	8,05	3,16	0,12
I	8,74	41,42	8,33	2,26	16,05	13,75	3,20	0,70	7,51
K	11,21	0,45	9,98	9,89	6,03	5,05	2,42	12,73	0,45
L	6,73	13,01	2,26	1,97	13,18	11,70	3,74	7,92	58,05
M	2,75	0,70	2,22	0,21	2,18	1,97	0,82	1,15	3,53
N	1,03	0,12	18,68	3,86	3,90	3,33	4,80	7,47	0,45
P	0,33	2,96	0,62	8,74	2,01	2,42	1,77	0,53	0,21
Q	3,82	0,90	6,49	5,62	3,00	3,98	7,96	10,43	0,29
R	6,65	0,37	0,94	3,78	2,26	2,30	2,01	10,67	0,25
S	6,57	1,15	7,10	7,55	2,26	3,57	6,49	5,99	0,12
T	4,76	1,60	2,87	3,90	3,20	4,35	8,09	4,15	0,21
V	12,40	32,39	2,18	2,91	6,28	6,81	5,38	2,01	17,61
W	2,13	0,04	0,08	0,21	1,93	3,49	0,25	0,00	0,00
Y	11,04	0,08	3,61	0,49	3,12	1,03	1,56	4,11	3,74
Gruppen									
DE	1,68	0,86	1,68	33,42	8,66	4,27	35,06	11,12	0,41
RHK	20,16	0,86	13,63	14,98	11,04	9,44	12,48	26,56	0,82
FWY	22,66	0,82	10,71	2,18	16,87	28,86	3,12	9,28	9,28
AST	16,75	5,34	31,03	16,58	9,61	10,92	20,20	15,80	1,68
AST+V	29,15	37,73	33,21	19,50	15,89	17,73	25,57	17,82	19,29
ILV	27,87	86,82	12,77	7,14	35,51	32,27	12,32	10,63	83,17

Abbildung 34: Vergleichende Darstellung der Häufigkeiten von Aminosäuren an verschiedenen Sequenzpositionen.

(A) Identifizierte DLA-88\*50101-Nonamere aus den Experimenten mit nicht infizierten C1R-DLA-88\*50101-Zellen.

(B) Identifizierte DLA-88\*50101-Nonamere von Barth et al. [128]. Die bevorzugten Anker-Aminosäuren sind jeweils in blau dargestellt.

Da sonst keine anderen Positionen eine derartige Anhäufung von bestimmten Aminosäuren aufwiesen, wurde davon ausgegangen, dass Position 2 und 9 in diesem Fall als Hauptanker dienten. Weitergehend wurde dieses Analysenergebnis mit dem Ergebnis der Analyse von DLA-88\*50101-Nonameren von Barth et al. [128] (Abbildung 34 B) verglichen. Hierbei zeigte sich jeweils in beiden Analysen eine Anhäufung derselben Aminosäuren an denselben Sequenzpositionen (in blau hervorgehoben). Weitergehend wurden die identifizierten DLA-88\*50101-Nonamere dazu verwendet, um mit Hilfe des Programms WebLogo das Bindemotiv für das Allel DLA-88\*50101 zu bestimmen (Abbildung 35 A). Anschließend wurde das auf diese Weise visualisierte Bindemotiv mit dem von Barth et al. [128] für DLA-88\*50101 präsentierten Bindemotiv (Abbildung 35 B) verglichen.



**Abbildung 35: Abgleich der vermutlichen Bindemotive für das Allel DLA-88\*50101.**

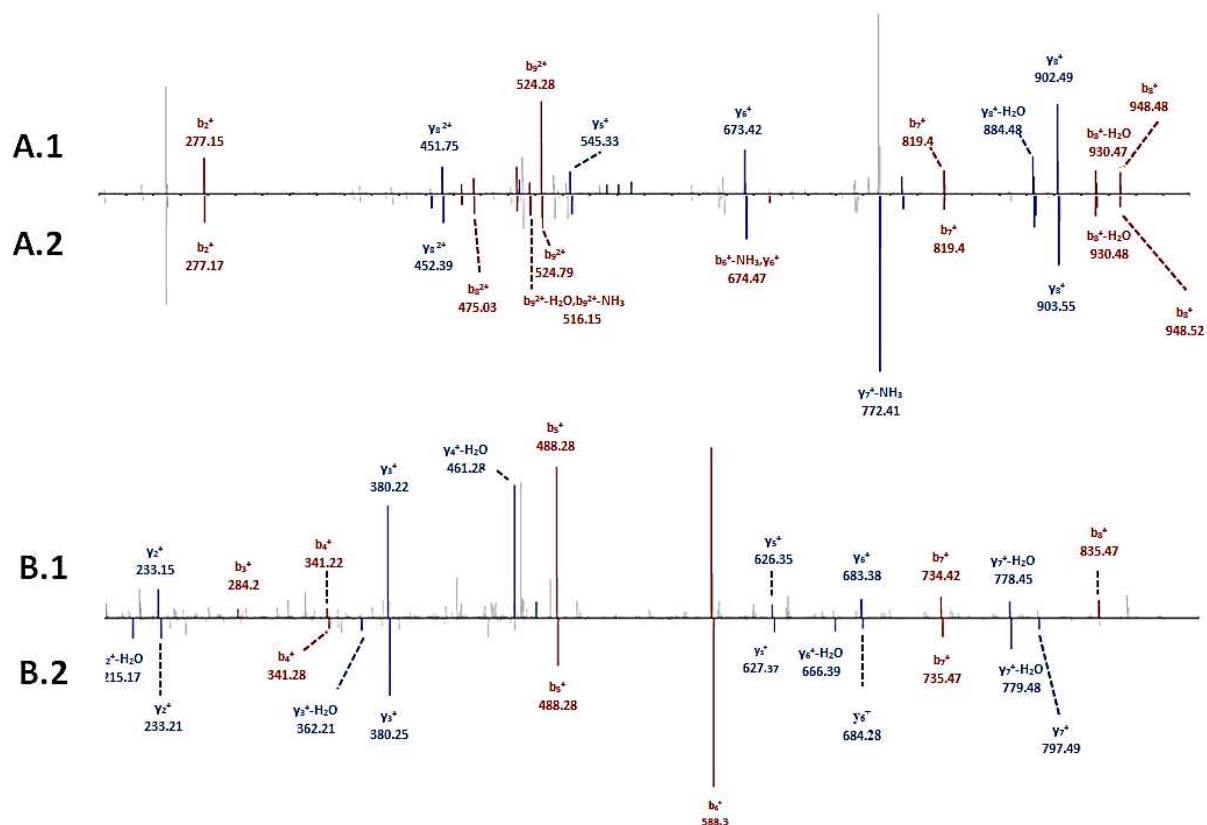
- (A) Bindemotiv bestimmt aus den DLA-88\*50101-Nonameren im Rahmen der vorliegenden Arbeit.
- (B) Bindemotiv für das Allel DLA-88\*50101 charakterisiert durch Barth et al. [128]



Hierbei zeigte sich ebenfalls in beiden Fällen eine Dominanz von Isoleucin, Leucin und Valin an Position 2 sowie von Leucin und Valin an Position 9. Somit konnte das vermutliche Bindemotiv für das Allel DLA-88\*50101 von Barth et al. [128] bestätigt werden.

## 4.4 Peptidbindungsassay

Wie bereits vorangehend beschrieben wurde, konnten Barth et al. [128] eine große Ähnlichkeit zwischen den Bindemotiven von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 feststellen. Im nächsten Schritt sollte daher nun die Bindungsfähigkeit ausgewählter Peptide an DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 überprüft werden. Hierzu wurden die Fragmentspektren der identifizierten natürlichen Liganden YINDKGKEVL und GILGFVFTL zunächst mit denen der zugehörigen synthetischen Peptide verglichen.



**Abbildung 36:** Bestätigung des experimentell bestimmten DLA-Liganden YINDKGKEVL (A) und des HLA-Liganden GILGFVFTL (B).

Hierbei wurden die Fragmentspektren der natürlichen Liganden (A.1/B.1) mit denen der korrespondierenden synthetischen Peptide (A.2/B.2) verglichen. Die Peptide konnten durch identische MS-Spektren verifiziert werden.

Es zeigten sich hierbei für beide Peptide jeweils identische MS-Spektren, wodurch die identifizierten Liganden vorausgehend bestätigt werden konnten (Abbildung 36). Anschließend wurden JY-Zellen, die homozygot für HLA-A\*02:01 sind, C1R- und C1R-DLA-88\*50101-Zellen jeweils mit FITC-markierten Peptiden (wie unter 3.2.1.7 beschrieben) inkubiert. Hierzu wurden zum einen die Influenza-peptide GILGFVFTL und YINDKGKEVL verwendet (siehe 4.2.4), zum anderen aber auch DALKEKVI, ein HLA-B\*51-Ligand als Negativkontrolle, und SVA-EKLSKL, ein C1R-DLA-88\*50101-Peptid mit starker Bindungskapazität hinsichtlich DLA-88\*50101. Die voraussichtlichen Bindungsaffinitäten gegenüber DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 waren im Vorfeld jeweils mit Hilfe der Epitopvorhersageprogramme SYFPEITHI@home sowie NetMHCpan 3.0 für die 4 Peptidsequenzen bestimmt worden. Tabelle 30 gibt Aufschluss über die erzielten SYFPEITHI@home-Scores als Prozentsatz der erreichten Werte am maximal möglichen Wert und den NetMHCpan 3.0-%-Rank. Die durchflusszytometrische Analyse der verschiedenen Ansätze erfolgte jeweils an einem FACSCalibur-Zytometer mit nachfolgender Visualisierung mittels des Programms FloJo 10.0.7. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wurde der Versuch insgesamt fünfmal durchgeführt. In Abbildung 37 sind exemplarisch die durchflusszytometrischen Ergebnisse des ersten Peptidbindungsversuchs dargestellt. Zu Beginn jeder Analyse wurden jeweils die Zellen, die zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität herangezogen wurden, für jede Zellart durch ein Gate innerhalb der jeweiligen Dot Plots festgelegt. Für jede Zellart wurden pro Peptid drei technische Replikate angefertigt, um die Varianz innerhalb der Analysen zu kontrollieren. Die Eigenfluoreszenz der Zellen, bei denen keine fluoreszenzmarkierten Peptide während der Inkubation verwendet wurden, ist in blau dargestellt, die Fluoreszenzkurven der Ansätze, die mit Peptid inkubiert wurden, in rot.

**Tabelle 30: Peptide, die zur Analyse der Bindungsfähigkeit auf HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 herangezogen wurden mit Angabe der zugehörigen MHC-Bindungsscores.**

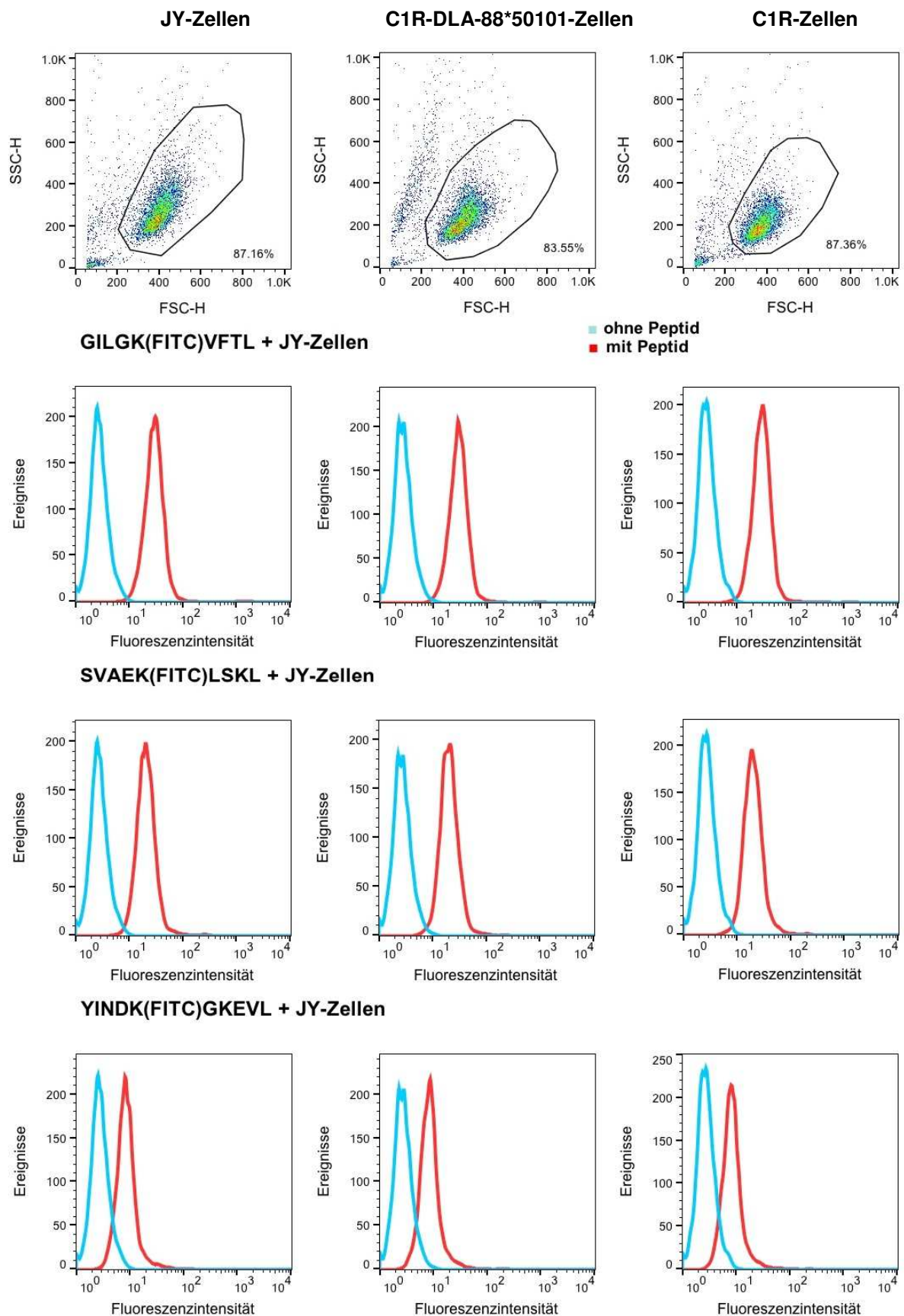
Peptid-Sequenz	SYFPEITHI-Score HLA-A*02:01	% of maximal possible SYFPEITHI-HLA-Score <sup>a</sup>	SYFPEITHI-Score DLA-88*50101	% of maximal possible SYFPEITHI-DLA-Score <sup>a</sup>	%-rank HLA-A*02:01	%-rank HLA-B*35:03	%-rank HLA-C*04:01
	SYFPEITHI @home	SYFPEITHI @home	SYFPEITHI @home	SYFPEITHI @home	NetMHCpan	NetMHCpan	NetMHCpan
YINDKGKEVL	22,0	64,7	25,0	86,2	13,0	7,5	4,0
GILGFVFTL	30,0	83,3	21,0	70,0	0,2	6,5	22,0
SVAEKLSKL	27	75,0	26	86,7	4,0	7,0	3,5
DALKEKVI <sup>b</sup>	-	-	-	-	90,0	49,0	90,0

YINDKGKEVL und SVAEKLSKL sind Peptide, die von DLA-88\*50101 stammen, GILGFVFTL ist ein HLA-A\*02:01-Ligand, DALKEKVI ein HLA-B\*51-assoziiertes Peptid, das als Negativkontrolle diente. YINDKGKEVL und GILGFVFTL sind zusätzliche Peptide, die ihren Ursprung in Influenzaquellproteinen haben.

<sup>a</sup>Prozentsatz der erreichten Werte am maximal möglichen Wert (HLA: 9mer 36; 10mer 34; DLA: 9mer 30; 10mer 29).

<sup>b</sup>Kein SYFPEITHI-Score, da keine Matrix verfügbar für Octamere.

Tabelle 31 gibt Aufschluss über die Mediane der Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen der verschiedenen Peptidbindungsversuche. Hierbei liefert die Betrachtung der Mediane des ersten Versuchs in Tabelle 31 sowie der Kurvenverläufe aus Abbildung 37 für die drei technischen Replikate eines Peptids jeweils ein relativ einheitliches Bild, wodurch von einer relativ niedrigen Variabilität der Analysemethode auszugehen war. Die Eigenfluoreszenz der Zellen erzielte, wie zu erwarten, in allen Versuchen die niedrigsten Fluoreszenzwerte (Abbildung 37 und Tabelle 31). An zweiter Stelle rangierten jeweils bei den JY- und den C1R-DLA-88\*50101-Zellen die Fluoreszenzwerte der Negativkontrollen, an dritter Stelle die Fluoreszenzwerte nach Inkubation mit dem Peptid YINDKGKEVL und an vierter Stelle die Werte nach Inkubation mit dem Peptid SVAEKLSKL. Die höchste Fluoreszenzintensität der Zellen konnte nach Inkubation mit dem Peptid GILGFVFTL gemessen werden.



**Abbildung 37: Exemplarische Darstellung der Dot Plots und Histogramme des ersten Peptidbindungsassays.**

In blau sind jeweils die Ansätze, bei denen kein Peptid bei der Inkubation verwendet wurde, gekennzeichnet, in rot die Ansätze mit Peptid.

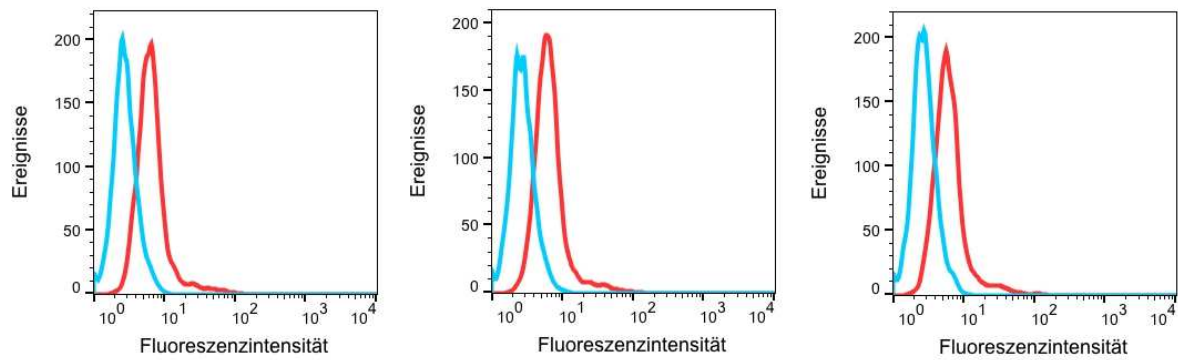
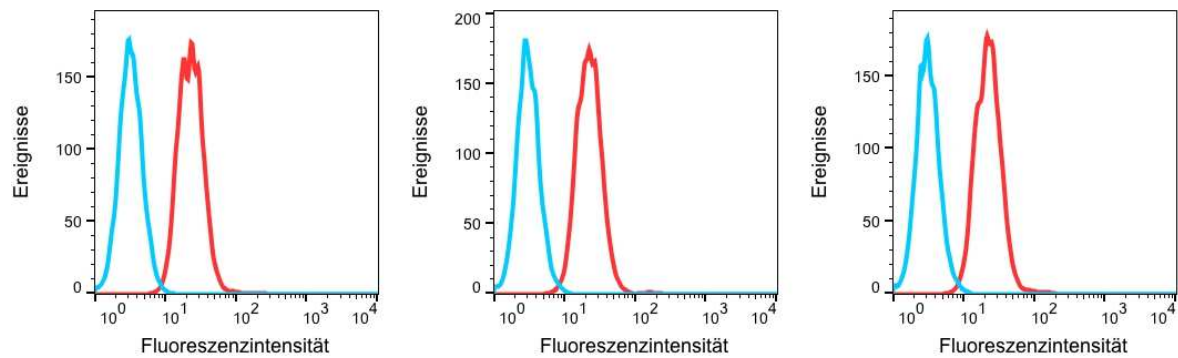
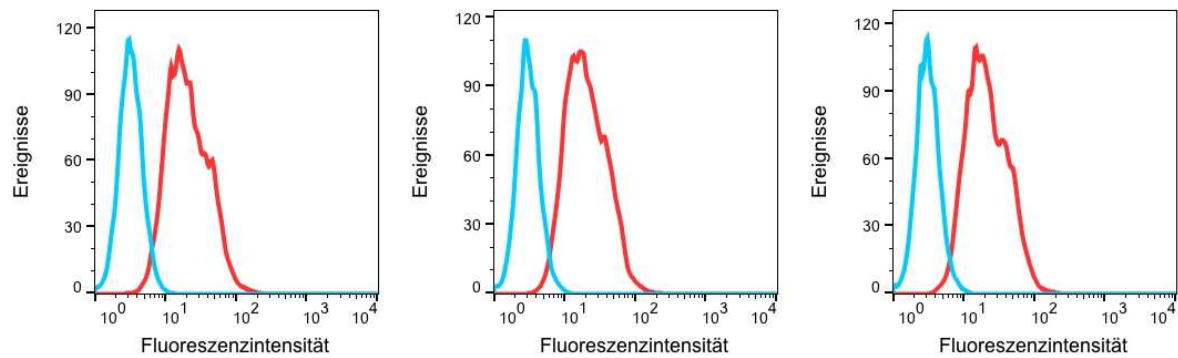
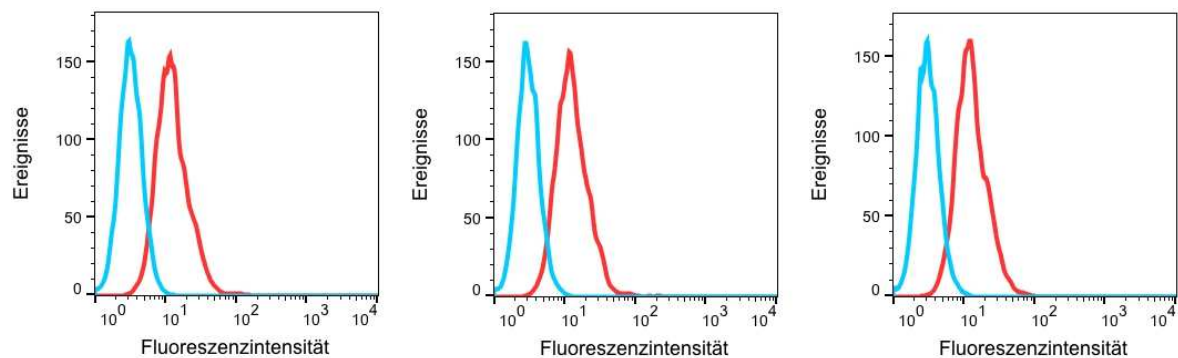
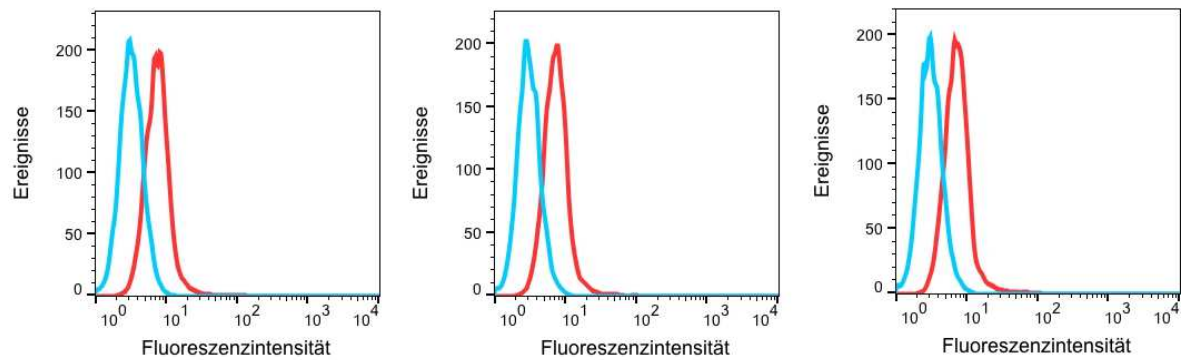
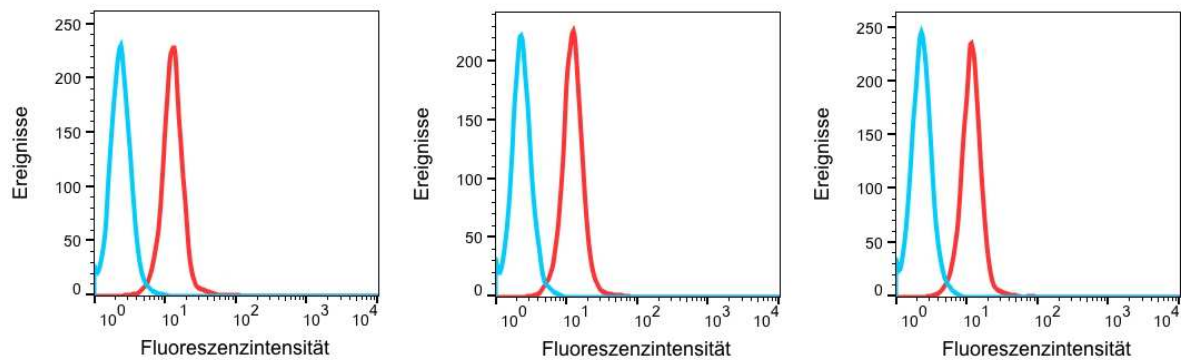
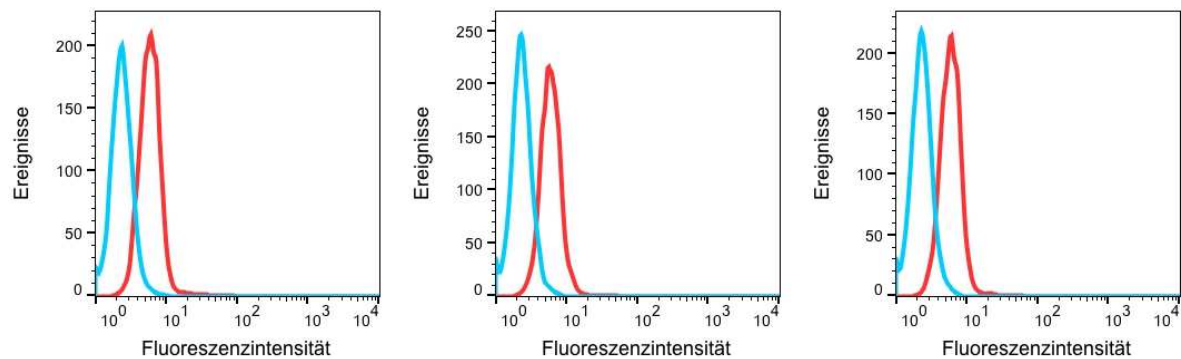
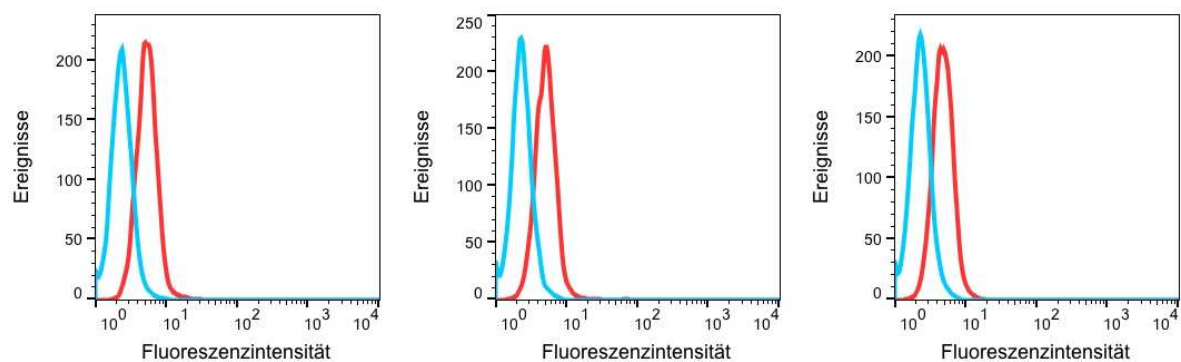
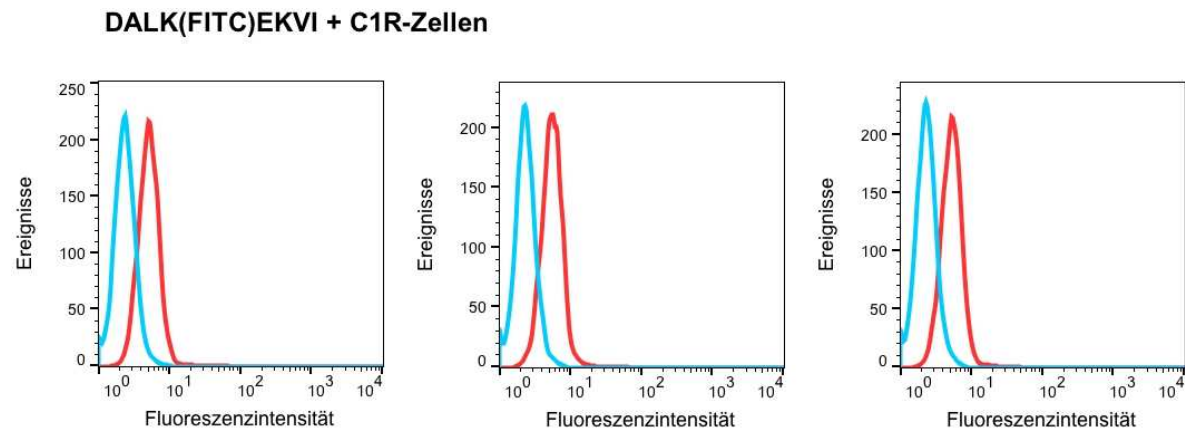
**DALK(FITC)EKVI + JY-Zellen****GILGK(FITC)VFTL + C1R-DLA-88\*50101-Zellen****SVAEK(FITC)LSKL + C1R-DLA-88\*50101-Zellen****YINDK(FITC)GKEVL + C1R-DLA\_88\*50101-Zellen**

Abbildung 37.1: Fortsetzung der exemplarischen Darstellung der Histogramme des ersten Peptidbindungsassays.

**DALK(FITC)EKVI + C1R-DLA-88\*50101-Zellen****GILGK(FITC)VFTL + C1R-Zellen****SVAEK(FITC)LSKL + C1R-Zellen****YINDK(FITC)GKEVL + C1R-Zellen**

**Abbildung 37.2:** Fortsetzung der exemplarischen Darstellung der Histogramme des ersten Peptidbindungsassays.





**Abbildung 37.3:** Fortsetzung der exemplarischen Darstellung der Histogramme des ersten Peptidbindungsassays.

Für die Ansätze, bei denen C1R-Zellen verwendet wurden, ergab sich beim Vergleich der Versuche untereinander ein weniger homogenes Bild. Für den zweiten und vierten Versuch konnte bei Betrachtung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten die gleiche Rangierung wie auch schon bei den anderen Zellarten beobachtet werden. Die verbleibenden Versuche zeigten ebenfalls eine große Übereinstimmung in der Rangierung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten, jedoch war hier für Ansätze, die mit dem Peptid YINDKGKEVL inkubiert wurden, jeweils eine niedrigere durchschnittliche Fluoreszenz als bei den Ansätzen mit dem Peptid DALKEKVI zu vermerken. Im Anschluss wurden die verwendeten Mediane der Fluoreszenzintensitäten, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, weiter ausgewertet. Hierbei ergaben sich jeweils besonders hohe Fluoreszenzintensitäten für die Ansätze, bei denen JY-Zellen, die homozygot für HLA-A\*02:01 sind und mit dem FITC-markierten HLA-A\*02:01-Influenzaepitop GILGKVFTL inkubiert worden waren, weshalb diese Fluoreszenzen für eine bessere Vergleichbarkeit jeweils auf 100 % gesetzt wurden (Abbildung 37, A und B). GILGFVFTL ist für seine starke Bindungsfähigkeit auf HLA-A\*02:01 bekannt und stellt mit einem SYFPEITHI-Score von 30 83 % des maximal möglichen Scores (Tabelle 29). Das FITC-markierte DLA-88\*88\*50101-Influenzaepitop YINDKGKEVL, mit 65 % des maximal möglichen Bindungsscores hinsichtlich HLA-A\*02:01, sowie der FITC-markierte DLA-88\*50101-Ligand SVAEKLKSL, mit 75 % des maximal möglichen Bindungsscores hinsichtlich HLA-A\*02:01, zeigten im Mittel 7 % und 67 % normalisierte Fluoreszenzintensität bei Inkubation mit JY-Zellen.

Tabelle 31: Mediane der Fluoreszenzintensitäten aus den Histogrammen der jeweiligen Peptidbindungsversuche.

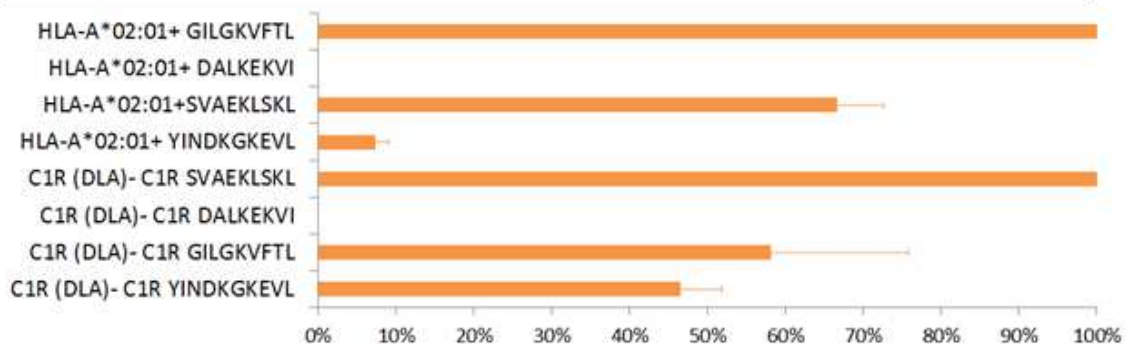
Versuch	Zellart	Ø Peptid			GILGFVFTL			SVAEKL SKL			YINDKGKEVL			DALKEKVI		
Ansatz		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
V1	JY	2,7	2,7	2,7	29,2	29,0	28,6	20,2	19,9	19,5	8,3	8,3	8,2	6,2	6,2	5,8
	C1R-DLA	3,2	3,0	3,1	22,5	22,0	21,9	19,0	18,9	19,7	11,8	12,1	12,3	7,4	7,3	7,1
	C1R	2,3	2,3	2,3	12,7	12,2	11,6	5,9	5,9	5,9	5,3	5,1	4,8	5,1	5,5	5,3
V2	JY	2,8	3,0	2,9	38,4	38,4	38,1	26,4	26,7	27,8	9,0	8,5	8,4	6,5	6,6	6,3
	C1R-DLA	2,5	2,5	2,5	19,5	21,3	18,9	17,4	17,1	17,5	11,6	11,6	11,5	5,9	5,7	5,7
	C1R	2,2	2,3	2,4	13,8	14,1	13,2	7,3	6,5	6,1	6,2	5,9	5,7	5,4	5,5	5,6
V3	JY	2,2	2,2	2,4	27,8	26,6	26,8	21,6	21,3	21,3	7,6	7,2	6,7	5,7	5,3	5,5
	C1R-DLA	3,3	3,2	3,2	18,8	17,8	16,9	15,1	14,2	14,5	9,7	9,7	9,4	6,7	6,4	6,1
	C1R	2,4	2,5	2,4	9,7	9,3	9,4	6,9	5,6	5,3	5,2	4,9	5,0	5,9	5,8	4,7
V4	JY	3,5	3,7	3,7	43,1	43,0	42,1	30,4	29,2	29,6	10,3	9,5	9,5	8,5	7,6	7,3
	C1R-DLA	3,8	4,1	3,9	26,9	26,6	26,5	30,3	29,2	29,9	17,2	17,4	17,7	9,6	9,1	9,0
	C1R	3,6	3,6	3,5	16,4	14,8	14,1	9,4	8,5	8,8	8,5	8,5	7,9	7,7	7,4	7,5
V5	JY	3,3	3,2	3,1	39,6	39,6	41,3	31,0	31,1	31,2	9,8	9,6	9,9	8,0	7,8	7,6
	C1R-DLA	3,0	3,0	3,0	23,8	23,1	22,6	23,0	23,3	23,6	14,4	14,2	14,3	7,0	6,6	6,7
	C1R	3,0	3,0	3,1	15,3	15,2	15,0	8,5	8,0	8,0	7,1	7,1	6,9	7,6	7,1	7,2



Der HLA-B\*51-Ligand DALKEKVI zeigte keine Bindungsfähigkeit bezüglich der JY-Zellen und diente als Negativkontrolle. Die Auswertung der Bindungsfähigkeit des DLA-88\*50101-Liganden SVAEKLSKL auf DLA-88\*50101 mit 87 % des maximal möglichen Bindungsscores hinsichtlich DLA-88\*50101, ergab im Hinblick auf DLA-88\*50101 die größten Fluoreszenzintensitäten und wurde daher auf 100 % gesetzt (siehe Tabelle 30, sowie Abbildung 38 A/B). Das HLA-A\*02:01-Influenzaeptid GILGKFVTL, mit 70 % des maximal möglichen SYFPEITHI-Scores bezüglich DLA-88\*50101, und das DLA-88\*50101-Influenzaeptid YINDKGKEVL, mit 86 % des maximal möglichen Bindungsscores hinsichtlich DLA-88\*50101, erzielten im Mittel 58 % und 47 % normalisierte Fluoreszenzintensität hinsichtlich DLA-88\*50101. Der HLA-B\*51-Ligand DALKEKVI zeigte ebenfalls keine Bindungsfähigkeit hinsichtlich DLA-88\*50101 und wurde erneut als Negativkontrolle verwendet. Die Ergebnisse zeigten somit jeweils für die Peptide SVAEKLSKL und YINDKGKEVL je nach Allotyp eine vermehrte Bindungsfähigkeit. Beide DLA-88\*50101-Liganden zeigten also bezüglich DLA-88\*50101 eine höhere Bindungsfähigkeit als bezüglich HLA-A\*02:01. Dieses Bild konnte auch durch die Ergebnisse, die mit dem HLA-A\*02:01-Liganden GILGKVFTL erzielt wurden, bestätigt werden, jedoch ist hier die normalisierte Fluoreszenzintensität des dritten Experiments hinsichtlich DLA-88\*50101 anzuzweifeln, da diese deutlich von den restlichen erzielten Werten abweicht. Erstaunlicherweise stehen diese Ergebnisse im Kontrast zu den Werten, die mittels Epitopvorhersageprogramm (Tabelle 30) bestimmt wurden. Hier war für alle Peptide eine relativ hohe Bindungsfähigkeit vorhergesagt worden, was sich insbesondere für das Peptid YINDKGKEVL nicht bestätigte.

**A**

	Normalisierte Fluoreszenzintensitäten in %					Mittelwert	Standard- abweichung
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	Experiment 4	Experiment 5		
C1R (DLA)- C1R GILGKVFTL	49	53	88	43	58	58	0,18
C1R (DLA)- C1R SVAEKL SKL	100	100	100	100	100	100	0,0
C1R (DLA)- C1R YINDKGKEVL	46	52	48	38	49	47	0,05
C1R (DLA)- C1R DALKEKVI	0	0	0	0	0	0	0,0
HLA-A*02:01+ GILGKVFTL	100	100	100	100	100	100	0,0
HLA-A*02:01+SVAEKL SKL	60	64	74	63	72	67	0,06
HLA-A*02:01+ YINDKGKEVL	10	7	8	6	6	7	0,02
HLA-A*02:01+ DALKEKVI	0	0	0	0	0	0	0,0

**B**

**Abbildung 38: Normalisierte Fluoreszenzintensitäten der Peptidbindungsversuche.**

- (A) Normalisierte Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen FITC-markierten Peptide pro Experiment unter Angabe der Mittelwerte und der Standardabweichung.
- (B) Visualisierung der Mittelwerte und Standardabweichungen aus (A).

## 5 Diskussion

Neben den konservativen Behandlungsmethoden in der Tumorthherapie, der chirurgischen Intervention sowie der Radio- und Chemotherapie existiert ein immer breiter werdendes Spektrum an alternativen Therapiemöglichkeiten, von denen einige vor allem in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen haben. Hierzu zählt unter anderem die Immuntherapie von Krebserkrankungen mittels tumorspezifischer Peptidvakzine. Hierbei werden mittels verschiedener Verfahren im Voraus selektierte und generierte tumorassoziierte und tumorspezifische Peptide in den Körper des Patienten injiziert, damit anschließend eine spezifische T-Zell-Immunantwort gegen Tumorzellen ausgelöst werden kann. Auf diese Weise wird der Körper in die Lage versetzt, entartete Zellen zu erkennen und selbst zu eliminieren [15]. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit bestanden aus zwei Teilen, wobei jeder für sich gesehen einen Beitrag zur Entwicklung von Peptidvakzinen gegen Tumoren beim Hund leisten sollte. Der erste Teil beschäftigte sich mit der Bestimmung der Bindespezifitäten für das canine Allel DLA-88\*03201, während im zweiten Teil zelluläre und virale HLA-A\*02:01- und DLA-88\*50101-Liganden miteinander verglichen wurden.

### 5.1 Auswahl von Zelllinien zur Transfektion von caninen MHC-Allelen

Für die Entwicklung von Peptidvakzinen beim Hund bedarf es zunächst, als einer der wichtigsten Schritte, der Bestimmung von Peptidbindemotiven für die am meisten exprimierten, bisher bekannten caninen MHC-Klasse-I-Allele. Zur Bestimmung von humanen Bindemotiven werden in der Regel MHC-Klasse-I-Liganden von humanen Zellen isoliert und massenspektrometrisch identifiziert. Anschließend erfolgt die Betrachtung der prozentualen Verteilung der Aminosäuren an den verschiedenen Positionen der Peptidsequenzen und der daraus resultierenden Bestimmung des Bindemotives [78, 158]. Für die Isolierung von MHC-Liganden existiert eine Reihe von Möglichkeiten, wobei im Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Universität in Tübingen schon seit vielen Jahren die Methode der Immunaффinitätschromatographie bevorzugt verwendet wird. Diese ermöglicht, durch die Verwendung MHC-spezifischer Antikörper, einen relativ hohen Reinheitsgrad der isolierten MHC-Liganden [79]. Da für die Immunaффinitätschromatographie mit caninen Zellen kein er-

schwinglicher DLA-spezifischer Antikörper zu Verfügung stand, wurden stattdessen humane C1R- und K562-Zellen verwendet, in welche die schwere Kette von DLA-88\*03201 und DLA-88\*50101 mittels Transfektion verbracht wurde. Die leichte Kette, das  $\beta_2$ -Mikroglobulin, wurde in diesem Fall von der humanen Zelle gestellt, wodurch die neu exprimierten Hybrid-MHC-Moleküle anschließend mittels des Antikörpers BBM.1 in der Immunaффinitätschromatographie und Durchflusszytometrie detektiert werden konnten. Beim Hund sind bisher vier Gene bekannt, die für funktionale MHC-Klasse-I-Komplexe kodieren, wobei hier DLA-88 auf Grund seines Polymorphismus besonders heraussticht [61, 62]. Für die Bestimmung der MHC-Bindenspezifitäten wurde im Rahmen dieser Arbeit das Allel DLA-88\*03201 ausgewählt, das bisher bei Boxern [63] gefunden werden konnte. Für die Bestimmung des caninen Bindemotives wurde humanen Zellen gegenüber den ebenfalls in der Forschung häufig verwendeten Mäusezellen der Vorzug gegeben, da diese vermutlich über eine geeignetere Antigenprozessierungsmaschinerie verfügen. Dies wird im Folgenden genauer erläutert. Wichtigste Werkzeuge zur Prozessierung von Antigenen innerhalb der Zelle stellen das Proteasom sowie der TAP dar. Obwohl das Proteasom in Eukaryoten allgemein sehr konserviert auftaucht [35, 161, 162] und somit beispielsweise humane, murine und canine Proteasome die gleichen Schneidespezifitäten aufweisen [163], existieren einige Untersuchungen, die die Vermutung nahelegen, dass speziesspezifische Schneidemuster, beispielsweise bei Maus und Mensch, bestehen [164, 165]. In vergangenen Studien hatten sowohl EBV-immortalisierte B-Zelllinien, maligne Zelllinien (die von B-Zellen stammten) als auch maligne Zelllinien des hämatopoetischen Systems eine hohe Expression von Immunoproteasomen aufgewiesen [166-168]; zusätzlich war eine konstitutive Expression von Immunoproteasomen auf antigenpräsentierenden Zellen festgestellt worden [169]. Somit wurde auch das Vorkommen von Immunoproteasomen in den zur Verfügung stehenden, EBV-immortalisierten, lymphoblastoiden Zelllinien angenommen und Untersuchungen über die Schneideaktivitäten des Immunoproteasomes von Maus und Mensch ebenfalls als Auswahlkriterien miteinbezogen. In der Vergangenheit zeigte die vergleichende Betrachtung der Schneideaktivitäten des murinen Proteasomes mit denen des murinen Immunoproteasomes uneinheitliche Ergebnisse. Eine Studie belegte, dass Proteasome von mit Interferon- $\gamma$  behandelten Mäusezellen eine vermehrte Menge an Peptiden mit hydrophobem C-Terminus und eine verringerte Menge an Peptiden mit saurem C-Terminus generierten [162]. Eine andere zeigte einen Anstieg der Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen Aktivitäten nach Stimulation von murinen Hepatomzellen

mit Interferon- $\gamma$  [170]. Dies stand wiederum im Kontrast zu Untersuchungen, bei denen die Interferon- $\gamma$ -Stimulation von Mäusezellen zu einer Abnahme der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität bei gleicher Trypsin-ähnlicher Aktivität führte [171]. Bei dem humanen Proteasom zeigten vergleichende Untersuchungen über die Schneidespezifitäten des konstitutiven Proteasomes gegenüber dem Immunoproteasom ein ähnlich inhomogenes Bild. Während in zwei Studien jeweils eine Zunahme der Chymotrypsin-ähnlichen und Trypsin-ähnlichen Aktivität nach Interferon- $\gamma$ -Stimulation vermerkt wurde [170, 172], zeigten andere Ergebnisse jeweils eine Zunahme der Chymotrypsin-ähnlichen und Trypsin-ähnlichen Aktivität nach der Inkorporation Interferon- $\gamma$ -induzierbarer proteasomaler Einheiten [173]. Somit konnte anhand von Untersuchungsergebnissen bezüglich der proteasomalen Schneideaktivitäten von Maus und Mensch nicht entschieden werden, ob murine oder humane Zellen in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung caniner Bindemotive favorisiert werden sollten. Jedoch hatten vorangegangene Untersuchungen gezeigt, dass der murine TAP im Vergleich zum humanen TAP ein verringertes Spektrum an Peptiden aufwies, die in das endoplasmatische Retikulum transportiert wurden. Während der murine TAP bevorzugt Peptide mit hydrophoben C-terminalen Aminosäuren transportierte, zeigte der humane TAP eine Präferenz für Peptide mit basischem oder hydrophobem C-Terminus [47, 128, 174]. Somit sprach die erhöhte Vielfalt an transportierten Peptiden durch das humane TAP für die Verwendung von humanen Zellen zur Bestimmung caniner Bindemotive.

## **5.2 Vergleich der Methoden zur Transfektion des caninen Allels DLA-88\*03201**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden verwendet, um C1R- und K562-Zellen mit dem Allel DLA-88\*03201 zu transfizieren: zum einen die Lipofektion mittels ScreenFectA-Transfektionskit oder Lipofectamine3000-Transfektionskit bei beiden Zelllinien, zum anderen die Elektroporation bei den C1R-Zellen. Während bei den C1R-Zellen mit keinem der beiden Transfektionskits ein Transfektionserfolg erzielt werden konnte und nur die Elektroporation sich als geeignete Methode herausstellte (Abbildung 15 und 16), konnte bei den K562-Zellen nach ergebnisloser Transfektion mittels Lipofectamine3000-Transfektionskit eine gelungene Transfektion mittels ScreenFectA-Transfektionskit erzielt werden (siehe 4.1.1.2). Zur Überprüfung des Transfektionserfolgs war jeweils ein Selekti-

onsmarker, der ein Geneticin-Neomycin-Resistenzgen enthielt, mit in die Zellen eingebracht worden. Außerdem konnte durch durchflusszytometrische Analysen der transfizierten Zellen ein Eindruck von deren DLA-Expression gewonnen werden. Für die verwendeten C1R-Zellen wurden hierzu zwei verschiedene Primärantikörper verwendet, da diese im natürlichen Zustand über eine eigene HLA-Expression verfügten [158]: zum einen der Antikörper BBM.1, der spezifisch für das  $\beta_2m$  des Menschen ist und somit sowohl an die neu exprimierten Hybrid-MHC-Moleküle (bestehend aus DLA und humanem  $\beta_2m$ ) als auch an die natürlich präsentierten HLA-Moleküle band, zum anderen der Antikörper W6/32, der spezifisch für die schwere Kette von HLA-A/-B/-C ist und folglich nur HLA-Moleküle detektiert. Durch die Differenz der mittels Sekundärantikörper bestimmten Mediane der Fluoreszenzintensitätskurven beider Antikörper konnte somit die DLA-Expression der Zellen abgeschätzt werden (Tabelle 14). Da die verwendeten K562-Zellen über keine eigene MHC-Expression verfügten [175], genügte in diesem Fall die alleinige Verwendung des Antikörpers BBM.1 zur Bestimmung der DLA-Expression (Abbildung 17). Bei den mittels Lipofektion transfizierten C1R-Zellen (siehe 4.1.1.1) sowie bei den K562-Zellen, die mittels Lipofectamine3000-Transfektionskit transfiziert wurden (siehe 4.1.1.2), gab bereits die ausbleibende Resistenz bezüglich des Antibiotikums G418 Aufschluss über das Scheitern der Transfektionsmethoden. Als Ursache für den ausbleibenden Transfektionserfolg kamen mehrere Faktoren in Betracht. Zum einen war zu überlegen, ob eine ausreichende Menge an DNA, wie sie vom Hersteller empfohlen worden war, zur Transfektion verwendet wurde. Dies war jedoch durch eine vorausgehende Konzentrationsmessung der DNA-Proben mit Hilfe eines NanoDrop1000-Spektralphotometers sichergestellt worden. Ein weiterer Grund, der möglicherweise Einfluss auf die Transfektionsfähigkeit hat, ist der Zustand der Zellen. Hierbei kann insbesondere eine hohe Passagezahl eine Transfektion der Zellen zu einem Zeitpunkt mit geringem Zellwachstum oder eine hohe Anzahl an toten oder in Mitleidenschaft gezogener Zellen zu einer verringerten Infektionsfähigkeit der Zellen führen [176]. Die verwendeten Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion gesplittet, mikroskopisch und mittels Vitalfärbung mit Trypanblau bei der Zellzahlbestimmung auf einen geringen Gehalt an toten oder versehrten Zellen im Medium untersucht, wodurch ein guter Zustand der verwendeten Zellen garantiert werden konnte. Außerdem waren die Zellen zusätzlich erst wenige Wochen vorher frisch aufgetaut worden. Somit konnte keiner der vorherigen Aspekte als Ursache angesehen werden. Des Weiteren kann die Kontamination mit Mikroorganismen, insbesondere Mykoplasmen, zu einer schlechten

Transfektionsfähigkeit führen [177]. Dieser Gesichtspunkt war für die C1R-Zellen relativ unwahrscheinlich, da alle Arbeiten kontinuierlich unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Medien in regelmäßigen Abständen erneuert worden waren. Für die K562-Zellen konnte diese Ursache durch einen negativen Mykoplasmentest ausgeschlossen werden. Schließlich kann auch die Verwendung eines unpassenden Vektors zu einer ausbleibenden Transfektion führen, jedoch hat der verwendete pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor in der Vergangenheit schon häufig seine Tauglichkeit bei einer Transfektion von C1R- und K562-Zellen bewiesen [178-180]. Auffallend bei der Transfektion von C1R-Zellen mittels Elektroporation war zusätzlich die in diesem Fall relativ geringe Transfektionseffizienz, da nach durchflusszytometrischer Analyse der transfizierten Zellen nur eine relativ geringe DLA-Expression detektiert werden konnte. Als eine Ursache hierfür könnte die Form, in der die DNA zur Transfektion vorlag, in Betracht gezogen werden. Bei der Transfektion von Zellen mit nicht linearisierten Plasmiden wird angenommen, dass hierbei immer wieder Enzyme innerhalb der Zellen in dem zu transfizierenden Genabschnitt schneiden, ihn dadurch zerstören und untauglich für eine Transfektion machen. Dies resultiert dann wiederum in einer niedrigen detektierbaren Transfektionseffizienz der jeweils ausgewählten Transfektionsmethode. Bei der Transfektion mit im Voraus linearisierten Plasmiden hingegen wird angenommen, dass hierdurch eine erhöhte Transfektionseffizienz erzielt werden kann, da die Plasmide bereits vor der Transfektion mittels spezifischer Restriktionsenzyme in Bereichen geschnitten wurden, die für die Transfektion irrelevant sind und somit eine erhöhte Anzahl an intakten Genabschnitten, die in das Genom der Zielzellen eingebaut werden können, zur Verfügung steht. Dies wird bestätigt durch Experimente von Stachbury und Münch (2010), bei denen die Verwendung von linearisierten Plasmiden einen erhöhten Transfektionserfolg aufwies im Vergleich zum Gebrauch von nicht linearisierten Plasmiden [181]. Bei der Transfektion von C1R-Zellen mittels Elektroporation konnte durch eine Agarosegelelektrophorese der Erfolg der vorausgehenden Linearisierung garantiert werden, wodurch die Verwendung von Plasmiden, bei denen die Linearisierung nicht funktioniert hatte, als Grund für den niedrigen Transfektionserfolg ausgeschlossen werden konnte. Es ist anzunehmen, dass darüber hinaus auch noch weitere, teilweise unbekannte Faktoren existieren, die für eine ausbleibende Transfektion oder einen niedrigen Transfektionserfolg von Zellen verantwortlich sind, deren Bestimmung jedoch der weiteren Forschung obliegt.

### 5.3 Bestimmung der Bindespezifitäten für das Allel DLA-88\*03201

Nach durchflusszytometrischer Analyse waren für die C1R-DLA-88\*03201-Zellen der Klon F8 (Abbildung 16) und für die K562-DLA-88\*03201-Zellen der Klon D6 (Abbildung 18) für eine weitere Kultivierung ausgesucht worden. Ausschlaggebend hierfür ist bei beiden die höchste vermutete DLA-Expression beim Abgleich der jeweiligen Klone miteinander gewesen. Für die anschließende Isolierung von MHC-Klasse-I-Liganden ist die Methode der Immunaффinitätschromatographie verwendet worden, da hierbei eine große Reinheit durch die Verwendung spezifischer Antikörper erzielt werden kann [79]. In diesem Fall wurde der Antikörper BBM.1 verwendet, der spezifisch für das humane  $\beta_2$ -Mikroglobulin ist. Nach der Isolierung der MHC-Liganden erfolgte deren Identifizierung mittels Massenspektrometrie. Hierbei lieferte das erste Experiment mit C1R-DLA-88\*03201-Zellen eine deutlich höhere Gesamtpeptidzahl als das zweite (Tabelle 18). Die Ursache kann in dem etwas anderen Ablauf der Vakuumzentrifugation des ersten Experiments gegenüber dem zweiten Experiment gesehen werden, da bei Letztgenanntem im Gegensatz zum Erstgenannten aus organisatorischen Gründen die Probe komplett eingetrocknet werden musste. Beim kompletten Eintrocknen der eluierten Liganden lagern sich diese an die Oberfläche des verwendeten Probengefäßes an und müssen anschließend durch die Verwendung von Lösungsmittel mit 80 % Acetonitril wieder in Lösung gebracht werden. Nachfolgende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass durch die Verwendung von organischem Lösungsmittel immer noch relativ viele Peptide an der Wand des Probengefäßes verbleiben und dass erstaunlicherweise wässrige Lösungsmittel mit einem geringen Acetonitrilgehalt an dieser Stelle deutlich mehr Peptide lösen können. Leider wurden diese Beobachtungen erst nach Abschluss der Experimente gemacht und eine Änderung des Protokolls von einem organischen zu einem wässrigen Lösungsmittel hin vorgenommen. Somit war davon auszugehen, dass die verminderte Anzahl an identifizierten Peptiden des zweiten Experiments der Tatsache geschuldet war, dass die Probe hier eingetrocknet wurde und infolgedessen ein Teil der eluierten Peptide in dem Probengefäß verblieb. Die verwendeten C1R-DLA-88\*03201-Zellen verfügten über eine natürliche HLA-Expression, somit musste hier die Anzahl an HLA-Liganden von der Gesamtzahl an identifizierten Peptiden abgezogen werden, um Peptide, die vom DLA stammten, zu erhalten. Die Zuordnung der Aminosäuresequenzen zu den jeweiligen HLA-Restriktionen ergab sich durch den Abgleich mit den Peptiddatenbanken SYFPEITHI und netMHC-3.4. Durch die



Substraktion der HLA-assoziierten Peptide von der Gesamtpeptidzahl konnten nachfolgend die Peptide, die vermutlich von DLA-Molekülen stammten, abgegrenzt werden. Ein Nachteil der hier verwendeten Methode der sauren Elution von MHC-Liganden liegt darin, dass zusätzlich unspezifische Peptide gelöst werden, die nicht von MHC-Molekülen stammen [79, 182]. Auf Grund dieser Tatsache, der geringen Anzahl an übereinstimmenden vermutlichen DLA-Liganden aller drei durchgeführten Experimente (Tabelle 19) sowie auf Grund des Umstands, dass es sich bei der Zuordnung mittels Ligandosphaere „nur“ um eine *in silico* generierte Vorhersage der voraussichtlichen HLA-Restriktionen der Liganden anhand von experimentell gewonnenen Daten handelte, wurde anschließend eine weitere Analyse der Peptide von den Experimenten mit C1R-DLA-88\*03201-Zellen mittels des Servers GibbsCluster-2.0 durchgeführt. Die Methode des Gibbs Clustering erlaubt die Detektion von rekonstruierten Bindemotiven in Peptiddatensätzen und dadurch zusätzlich, dass Peptide, die keinem Motiv zugeordnet werden konnten (also möglicherweise Kontaminanten darstellen) aussortiert werden können [154, 155]. In der Folge zeigten die Peptide des ersten und zweiten Experiments jeweils eine Zuordnung zu Motiven, die sehr stark den vorher bestimmten Bindemotiven von HLA-B\*35:03 und HLA-C\*04:01 ähnelten, und nur eine sehr geringe Anzahl an nicht zuzuordnenden Peptiden (Abbildung 20 und Tabelle 20). Somit konnte auf diese Weise keine Selektion möglicher DLA-Liganden durchgeführt werden. Daher wurde als weiterer Versuch, vermutliche DLA-Peptide aus den Experimenten mit C1R-DLA-88\*03201-Zellen zu selektieren, ein Abgleich der Gesamtpeptide des ersten und zweiten Experiments mit einem Datensatz von 39945 HLA-B\*35:03- und HLA-C\*04:01-zugeordneten Peptiden, der in diesem Haus generiert wurde, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass 273 Peptidsequenzen mit den Sequenzen aus dem großen Peptidpool übereinstimmten, woraus die Annahme resultierte, dass diese Peptide ebenfalls HLA-assoziiert waren. Weiterhin zeigten 57 Peptide keine Übereinstimmung in ihrer Sequenz mit den HLA-assoziierten Peptiden, wodurch angenommen wurde, dass diese vom DLA stammten und somit, gemeinsam mit den identifizierten K562-DLA-88\*03201-Liganden, zur Bestimmung der Bindspezifitäten von DLA-88\*03201 verwendet werden konnten. Bei der Charakterisierung von Bindemotiven werden die Bindungsansprüche, die ein MHC-Molekül an seine Peptidliganden stellt und die je nach MHC-Allel variieren, definiert [31]. In der Vergangenheit wurde schon eine Vielzahl von unterschiedlichen MHC-Klasse-I-Bindemotiven bei verschiedenen Spezies bestimmt, wie beispielsweise beim Menschen, bei der Maus, beim Rind oder auch beim Huhn [78, 183, 184]. Jedoch wurden

bisher nur in zwei Arbeiten die vermutlichen Bindespezifitäten zweier DLA-Allele thematisiert. Hierbei handelte es sich zum einen um eine Veröffentlichung von Ross et al. [185], in der das voraussichtliche Bindemotiv für das Allel DLA-88\*50801 definiert wurde und um die Arbeit von Barth et al. [128], bei der das Bindemotiv für das Allel DLA-88\*50101 bestimmt werden konnte. Ross et al. [185] verwendeten hierfür 36 DLA-assoziierte Peptide, während für die Analyse von Barth et al. [128] 3 720 Peptide genutzt wurden. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte insgesamt auf eine Anzahl von 289 vermutlichen DLA-88\*03201-Liganden zurückgegriffen werden, um die Bindungsspezifitäten des Allels DLA-88\*03201 zu analysieren. Die verwendeten DLA-Hybridzellen verfügten über eine humane Antigenprozessierungsmaschinerie, welche im Voraus die präsentierten Peptidantigene selektiert und zugeschnitten hatte. Als wichtiger Teil hiervon ist der TAP-Komplex zu nennen, der in der Vergangenheit eine starke Präferenz für Peptide mit hydrophobem oder basischem C-Terminus gezeigt hatte [47, 48]. Da infolgedessen angenommen wurde, dass diese Selektivität einen starken Einfluss auf das präsentierte Peptidspektrum der MHC-Komplexe hat, wurden weitergehend 74 Peptide mit saurem oder polarem C-Terminus von der weiteren Analyse ausgeschlossen (Tabelle 21). Für die weitere Bestimmung des Bindemotives von DLA-88\*03201 wurden somit 50 Nonamere verwendet, da diese insgesamt am häufigsten unter den Octa-, Nona- und Decameren gefunden worden waren und zudem Peptide dieser Länge in der Regel auch am häufigsten auf MHC-Klasse-I-Molekülen vertreten sind [186, 187]. Die nachfolgende Bestimmung der prozentualen Verteilung der Aminosäuren an Positionen innerhalb der Peptidsequenzen ergab eine Dominanz von Phenylalanin (28 %) und Leucin (24 %) am C-Terminus. Dies sind unpolare, hydrophobe Aminosäuren, die auch schon beim Menschen beispielsweise bei den Allelen HLA-B\*39:09 und HLA-B\*27:07 als Ankerpositionen an dieser Stelle definiert werden konnten [188, 189]. Außerdem dominierten Asparaginsäure (20 %) und Valin (20 %) als mögliche Ankeramino-säuren an erster Stelle der Sequenzen. Obwohl beim Menschen in der Regel die zweite und neunte Position als Ankerposition detektiert werden und diese Verteilung der Ankerpositionen zunächst ungewöhnlich erscheinen mag, wurde bei anderen Spezies, wie beispielsweise beim Huhn und beim Rind, bereits von einer von dem ersten Schema abweichenden Verteilung der Ankerpositionen berichtet [184, 190]. Wie bereits vorangehend erläutert wurde, verwendeten Ross et al. [185] 36 Peptide, um die Bindespezifitäten eines DLA-Allels zu definieren. In der vorliegenden Arbeit wurden hierfür 50 Peptide eingesetzt. Obwohl mit diesen Peptidzahlen bereits

Hinweise auf die möglichen Bindemotive geliefert werden konnten, sollten in der Zukunft noch weitere DLA-88\*50801- und DLA-88\*03201-Peptide hinsichtlich ihrer Bindspezifitäten analysiert werden, um die Ergebnisse zu validieren und die statistische Kreditabilität zu steigern.

## **5.4 Bestimmung der Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen**

Damit virale DLA-88\*50101-Peptide isoliert werden konnten, musste vorausgehend die Infizierbarkeit der hierfür verwendeten C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit dem Influenza-A-Virus H1N1 sichergestellt werden. Auf Grund der Tatsache, dass diese bei Influenzaviren im Allgemeinen von verschiedenen Umständen abhängt, war die erfolgreiche Infektion von C1R-DLA-88\*50101 nicht als selbstverständlich anzusehen. Als einer der wichtigsten Faktoren sei beispielsweise die Präferenz unterschiedlicher Influenzasubtypen bezüglich der von ihnen gewählten Sialinsäure-haltigen Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche genannt, da nur durch die Bindung des viralen Hämagglutinins an Sialinsäure-haltigen Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche eine nachfolgende Endozytose des Viruspartikels ermöglicht wird [191]. So bindet zum Beispiel das Hämagglutinin von Influenzasubtypen, die an den Menschen angepasst sind, vermehrt an  $\alpha$ 2,6-gebundene Sialinsäure [192]. Folglich lässt sich erklären, warum an den Menschen angepasste Influenzaviren in der Regel Symptome im oberen Respirationstrakt hervorrufen, da dort, im Gegensatz zu anderen Bereichen des Körpers, vor allem  $\alpha$ 2,6-gebundene Sialinsäuren auf den Rezeptoren der Epithelzellen vorkommen [193]. In der heutigen Zeit existiert eine Vielzahl von Zelllinien, die experimentell häufig zur Infektion mit Influenzaviren verwendet wurden, wobei hier insbesondere auch die canine Nierenepithelzelllinie MDCKII zu erwähnen ist, die sowohl  $\alpha$ 2,3- als auch  $\alpha$ 2,6-gebundene Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche aufweist [194]. Jedoch liegen bisher nur relativ wenige Angaben über die direkte Infektion von B-Zellen vor. Obwohl es in der Vergangenheit schon gelungen war, die B-lymphoblastoiden C1R-Zellen mit dem Influenza-A-Virus H1N1 zu infizieren [195] und somit auch eine erfolgreiche Infektion der C1R-DLA-88\*50101-Zellen anzunehmen war, wurde der praktische Nachweis bezüglich der verwendeten Transfektanten noch nicht erbracht. Zur Bestimmung der Infektionsrate wurden jeweils mehrere Ansätze genutzt, wobei die verwendeten C1R-DLA-88\*50101-Zellen zunächst einheitlich mit Influenza-A-Virus H1N1 infiziert, anschließend jedoch unterschiedlich lange inkubiert wurden. Als Zeitintervall wurden jeweils

9 Std., 12 Std. und 15 Std. ausgewählt. Als Primärantikörper wurde der Antikörper MCA-400 verwendet. Die Auswertung am FACSCalibur-Zytometer ergab zunächst eine im Zeitverlauf ansteigende Infektionsrate der Zellen und schließlich, ab einem gewissen Zeitpunkt, auch wieder deren Absinken. Während nach einer 9-stündigen Inkubation weitere 3 Std. noch eine Zunahme der Infektionsrate um 1 % erlaubten, konnte nach 15 Std. bereits ein Rückgang der Infektionsrate ausgemacht werden. Das Bild, dass die Infektionsraten im zeitlichen Verlauf geliefert hatten, konnte in der Vergangenheit beispielsweise auch schon bei der durchflusszytometrischen Analyse von MDCKII-Zellen, nach Infektion mit Influenza-A-Virus H1N1, detektiert werden. Jedoch wurde hierbei der Zeitpunkt mit der maximalen Infektionsrate erst etwas später erreicht [196]. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass sich zum einen C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit dem Influenza-A-Virus H1N1 infizieren lassen und zum anderen, dass die Infektionsrate der Zellen nach 12-stündiger Inkubation vermutlich am höchsten ist. Auf Grund der Tatsache, dass nach viraler Infektion in der Regel sowohl virale als auch zelluläre Peptide aus dem Peptidpool der jeweiligen Zelle auf den MHC-Komplexen präsentiert werden [197], wurde somit angenommen, dass eine Zellernte für die Immunaффinitätschromatographie nach 12-stündiger Inkubation eine möglichst große Ausbeute an viralen DLA-Liganden ermöglichen sollte.

## **5.5 Infektionsfähigkeit von C1R-DLA-88\*50101-Zellen ohne die Verwendung von Trypsin**

Wie vorausgehend schon erwähnt wurde, müssen Inflenzaviren zunächst an Sialinsäurehaltige Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche binden, um anschließend per Endozytose ins Zellinnere gelangen zu können. Ein weiterer Faktor, der zusätzlich über die Infektiosität von Inflenzaviren entscheidet, ist die Spaltung des viralen Oberflächenproteins Hämagglutinin in seine zwei Untereinheiten. Je nachdem wie die Spaltstelle des Hämagglutinins gestaltet ist, können hierfür unterschiedliche Proteasen verwendet werden. Während das Hämagglutinin von niedrigpathogenen Inflenzaviren in der Regel von Trypsin-ähnlichen Proteasen gespalten werden kann, wird das Hämagglutinin hochpathogener Inflenzaviren normalerweise von Furin-ähnlichen Proteasen geschnitten [198]. Passend hierzu wird in der Zellkultur, beispielsweise zur Replikation von Inflenzaviren in MDCKII-Zellen, häufig die Protease Trypsin ergänzt, um eine Infektion der Zellen und damit eine hohe Virusproduktion zu ge-

währleisten [143]. Bei denen in der nachfolgenden Immunaффinitätschromatographie selektierten MHC-Molekülen handelte es sich um Oberflächenproteine, die durch Proteasen gespalten werden können. Daher ist von einem dezimierenden Einfluss des Trypsins auf die MHC-Expression und die Menge der eluierten Peptidliganden auszugehen. Somit wurde weitergehend überprüft, ob sich C1R-DLA-88\*50101-Zellen auch ohne die Verwendung von Trypsin im Medium effizient infizieren lassen. Hierzu wurde jeweils ein Ansatz mit C1R-DLA-88\*50101-Zellen ohne Trypsin im Medium infiziert und ein Ansatz mit Trypsin im Medium. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und eine FACS-Färbung mit dem Primärantikörper MCA-400 wurde durchgeführt, der spezifisch für das Nukleoprotein von Influenza-A-Viren ist. Das Experiment wurde insgesamt zweimal durchgeführt, und, erstaunlicherweise, konnte beide Male eine höhere Infektionsrate ohne die Verwendung von Trypsin im Medium während der Inkubation erreicht werden als mit (Tabelle 23). Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die verwendeten C1R-DLA-88\*50101-Zellen über eine endogene Proteasenexpression verfügen, die es ermöglicht, das virale Hämagglutinin zu spalten. In vorangegangenen Untersuchungen anderer Forschungsgruppen war Trypsin jeweils auf Grund seiner steigenden Wirkung auf die Influenzavirusproduktion verwendet worden [143]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei der Verwendung von Trypsin eher eine gegenteilige Wirkung auf die Infektionsrate vermerkt werden. Ein Grund für die erhöhte Infektionsrate der ohne Trypsin infizierten Zellen gegenüber der mit Trypsin infizierten Zellen mag möglicherweise in einer niedrigeren Schneideaktivität der Protease Trypsin gegenüber der Schneideaktivität der Proteasen, die von den C1R-DLA-88\*50101-Zellen exprimiert wurden, liegen. Da beide quasi um die Schnittstellen konkurrieren, ist somit möglicherweise zu erklären, warum die Zellen, die mit Trypsin inkubiert wurden, eine geringere Infektionsrate aufwiesen. Ein anderer, wenn auch nicht sehr wahrscheinlicher Grund könnte sein, dass das verwendete Trypsin die endogenen Proteasen der Zelle schneidet, dadurch inaktiviert und somit insgesamt weniger Trypsin und endogene Proteasen übrig bleiben, die das Hämagglutinin schneiden können. Möglicherweise können zukünftige Untersuchungen mit infizierten C1R-DLA-88\*50101-Zellen Aufschluss über die hierbei aktiven Proteasen liefern und somit die hier erzielten Ergebnisse erklären. An dieser Stelle konnte gezeigt werden, dass sich C1R-DLA-88\*50101-Zellen auch ohne die Verwendung von Trypsin effizient infizieren lassen, so dass vor der nachfolgenden Immunaффinitätschromatographie eine Infektion ohne Trypsin durchgeführt werden konnte.

## 5.6 Vergleich zellulärer und viraler HLA-A\*02:01- und DLA-88\*50101-Liganden

Die Ergebnisse von Barth et al. [128] zeigten in der Vergangenheit eine große Übereinstimmung zwischen den Bindemotiven von HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 [128]. Hierbei konnte bereits die große Ähnlichkeit der Bindemotive infolge einer möglichen HLA-A\*02:01-Expression der C1R-DLA-88\*50101-Zellen ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit sollte weitergehend das Peptidrepertoire von HLA-A\*02:01 mit dem von DLA-88\*50101 verglichen werden. Hierzu wurden zunächst C1R-HLA-A\*02:01- und C1R-DLA-88\*50101-Liganden mittels Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung des Antikörpers BBM.1 isoliert und anschließend mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Nach Abzug der Liganden (die den im natürlichen Zustand von C1R-Zellen exprimierten MHC-Molekülen zugeordnet wurden [158]) von dem jeweiligen Gesamtpeptidpool erfolgte die Gegenüberstellung der verbleibenden HLA-A\*02:01- und DLA-88\*50101-Peptide. Hierbei konnten zunächst 268 übereinstimmende Quellproteine als gemeinsame Wurzel der verglichenen Peptide aufgezeichnet werden. Dies entsprach 23,3 % der jeweils insgesamt zugeordneten Quellproteine für DLA-88\*50101 und 25,9 % für HLA-A\*02:01. Trotz dieser relativ hohen Anzahl an identischen Quellproteinen und den relativ ähnlichen Bindemotiven von HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 konnten jedoch nur 96 (3,4 %) identische Peptidsequenzen gefunden werden. Weitergehend zeigte ein Vergleich der Abundanzen der Liganden, die mittels Volcano Plot auf HLA-A\*02:01 und DLA-88\*50101 gefunden wurden, dass sogar nur 40 der 96 gemeinsamen Peptide als signifikant eingestuft wurden. Im Anschluss wurden jeweils JY-Zellen, die HLA-A\*02:01 auf ihrer Oberfläche tragen, sowie C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit Influenza-A-Virus H1N1 infiziert. Ziel war es, hierdurch die gleichen exogenen Quellproteine in die Wirtszellen einzubringen. Die nachfolgende Selektion und Analyse der viralen HLA-A\*02:01- und DLA-88\*50101-Liganden ergab keine Überschneidung zwischen den Identitäten unterschiedlichen Ursprungs, ungeachtet der Verwendung der gleichen Quellproteine sowie der hohen Ähnlichkeit in den Bindemotiven. Ausschlaggebende Faktoren für die Auswahl intrazellulärer Peptide für eine spätere Präsentation durch MHC-Komplexe stellen verschiedene Selektionsprozesse innerhalb der Zelle dar. Hierzu gehören insbesondere das Proteasom, der TAP-Komplex sowie die Affinität des Peptid bindenden Spalts. Da das Proteasom von Mensch und Hund über die gleichen Trypsin-, Caspase- und Chymotrypsin-ähnlichen proteolytischen Aktivitäten verfügt [163, 199] und zudem dessen

Primärstruktur bei Säugetieren als höchst konserviert betrachtet wird [35, 161, 162], wurde davon ausgegangen, dass die Verwendung eines humanen Proteasomes an Stelle eines caninen Proteasomes wahrscheinlich keinen entscheidenden Einfluss auf das auf der Zelloberfläche präsentierte Peptidspektrum hat. Da jedoch einige wenige Untersuchungen existieren, die speziesspezifische Schnittmuster vermuten lassen [164, 165], ist an dieser Stelle jedoch die Möglichkeit nicht vollständig auszuschließen, dass die Verwendung eines humanen Proteasomes anstelle eines caninen Proteasomes einen modulierenden Effekt auf das präsentierte MHC-Peptidspektrum hat. Weitergehend lassen die Resultate den Schluss zu, dass bei der Auswahl von Peptiden, die anschließend auf den MHC-Komplexen gebunden werden, in erster Linie wohl nicht die Selektivität des Proteasomes und des TAP-Komplex entscheidend sind, sondern dass viel eher die Affinität des Peptid bindenden Spalts für spezifische Peptidsequenzen eine Rolle spielt. Dies geht konform mit verschiedensten Forschungsergebnissen, denen zufolge angenommen wird, dass MHC-Komplexe im endoplasmatischen Retikulum in mehreren Runden mit Peptiden beladen werden, wobei sich die Liganden mit niedriger Affinität jeweils wieder ablösen, und zwar so lange bis am Ende jeweils nur Peptide mit relativ hoher Affinität auf den MHC-Komplexen verbleiben [200-202]. Dies stützt die Annahme, dass sich die verwendeten humanen DLA-Transfektanten gut für eine Bestimmung caniner Bindemotive eignen, obwohl deren Antigenprozessierungsmaschinerie von der im Naturzustand in Hundezellen exprimierten abwich, jedoch wird in Zukunft nur der Vergleich des Peptidrepertoires von humanen DLA-Hybridzellen mit dem Peptidrepertoire von caninen Zellen mit dem gleichen DLA-Allel den endgültigen Nachweis ermöglichen.

## 5.7 Identifikation von viralen DLA-88\*50101-T-Zell-Epitopen

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal 8 Influenza-A-Peptide von caninen MHC-Klasse-I-Molekülen mit dem Allel DLA-88\*50101 eluiert und anschließend identifiziert werden. Bei der Immunantwort gegen Influenza-A-Viren spielen zytotoxische T-Zellen, die spezifische Peptidepitope erkennen können, eine entscheidende Rolle. In der Vergangenheit hatte sich gezeigt, dass neben der humoralen Immunität auch eine zelluläre, T-Zell-basierte Immunität gegen Influenzaviren eine signifikante Rolle spielt [203-205]. Bisherige Impfstrategien gegen Influenzaviren beruhen auf der Bildung von Antikörpern, die spezifisch gegen das Oberflächenprotein Hämagglutinin der Influenzaviren gerichtet sind [206]. Auf der einen

Seite bietet diese Methode bisher den besten Schutz gegen Influenzaviren, auf der anderen Seite muss der jeweilige Impfstoff jedoch genau auf die jeweiligen temporär kursierenden Influenzastämme ausgerichtet sein [207, 208]. Im Gegensatz dazu könnten T-Zellen zur Bekämpfung von Influenzaviren die Möglichkeit bieten, einen breiteren Schutz gegen verschiedene Influenzavirenstämme zu erzielen, da diese möglicherweise konservierte virale Peptide aus dem Zellinnern erkennen können [209, 210]. Das Wissen, das aus den neu identifizierten DLA-Bindungsspezifitäten und den identifizierten Influenzaepitopen resultiert, könnte unter anderem dazu beitragen, die Immunantwort caniner Zellen sowie die T-Zell-Reaktionen beim Hund im Rahmen verschiedener Infektionskrankheiten in Zukunft besser verstehen zu können. Obwohl Influenzavirusinfektionen beim Hund bisher keinen besonders hohen Stellenwert eingenommen haben, so könnte sich dies möglicherweise in Zukunft ändern, da beim Hund in der Vergangenheit auch schon Infektionen mit aviärem Influenzavirus nachgewiesen werden konnten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass aviäre Influenzaviren in der Regel bevorzugt an  $\alpha 2,3$ -gebundene Sialinsäuren binden können [211] und beim Hund sowohl  $\alpha 2,3$ - als auch  $\alpha 2,6$ -gebundenen Sialinsäuren auf der Oberfläche der Epithelzellen des oberen und unteren Respirationstrakts festgestellt werden konnten [212]. Da zwischengeschaltete Wirte, die als sogenannte „*mixing vessels*“ dienen, bei der Infektion von Menschen von Bedeutung sein können [213], stellt eine genetische Reassortierung und damit eine Überwindung zwischenartlicher Barrieren durch hochpathogene Influenza-A-Viren eine latente Gefahr für den Menschen dar [113]. Eine Möglichkeit, die potentielle Bedrohung, die Hunde als „*mixing vessels*“ in der Zukunft für den Menschen darstellen könnten, zu verringern, könnte die Entwicklung eines universellen Influenzaimpfstoffes für Mensch und Hund sein, der auf einer breiten, T-Zell-basierten Immunität beruht, dessen Entwicklung jedoch noch weiterer Forschungsarbeit bedarf [214].

## **5.8 Untersuchung der Bindungsfähigkeit auf DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01**

Peptidbindungsassays werden in der Immunologie häufig verwendet, um die MHC-Bindungsaffinität vorhergesagter MHC-Liganden zu messen [215, 216]. Wie oben schon erwähnt wurde, hatten Barth et al. [128] bereits eine große Ähnlichkeit zwischen den Bindemotiven von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01 feststellen können. Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Bindungsfähigkeit ausgewählter Peptide an DLA-88\*50101



und HLA-A\*02:01 überprüft werden. Verwendet wurden hierfür jeweils zwei im Voraus identifizierte und validierte virale MHC-Liganden, die neu synthetisiert und mit Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden: zum einen das von HLA-A\*02:01 stammende Influenzaeptid GILGVFTL und zum anderen das DLA-88\*50101-Influenzaeptid YINDKGKEVL. Als Negativkontrolle wurde das Fluoreszenzfarbstoff-markierte Peptid DALKEKVI verwendet, ein HLA-B\*51-Ligand. Zur Festlegung eines Referenzwertes wurde zusätzlich das Fluoreszenzfarbstoff-markierte Peptid SVAEKLSKL verwendet, das eine starke Bindungsfähigkeit in Bezug auf DLA-88\*50101 zeigt. Für jedes der eingesetzten Peptide wurde jeweils eine Vorhersage der Bindungsaffinität mittels bioinformatischer Epitopvorhersageprogramme getroffen. Die Ergebnisse zeigten für die zwei verwendeten Influenzaepeptide sowie das DLA-assoziierte Peptid SVAEKLSKL jeweils Allotyp-spezifisch eine vermehrte Bindungsfähigkeit. Das heißt, dass die DLA-assoziierten Peptide SVAEKLSKL und YINDKGKEVL jeweils eine höhere Bindungsfähigkeit hinsichtlich DLA-88\*50101 als in Bezug auf HLA-A\*02:01 aufwiesen. Außerdem zeigte sich, dass das HLA-assoziierte Peptid GILGVFTL wiederum eine höhere Bindungsfähigkeit bezüglich HLA-A\*02:01 als bezüglich DLA-88\*50101 aufwies. Dies stand in Kontrast zum Bindungsscore der Epitopvorhersageprogramme, wonach die Peptide jeweils bei beiden Allotypen eine ähnlich hohe Bindungsfähigkeit hätten zeigen müssen. Da der Hund als erste Tierart domestiziert wurde [217] und deshalb über eine lange gemeinsame Geschichte mit dem Menschen verfügt, wurde schon öfters die Vermutung aufgestellt, dass die Entwicklung der MHC-Moleküle des Menschen und des Hundes, infolge einer Koevolution mit den gleichen Pathogenen, ähnlich abgelaufen sein könnte. Diese Hypothese wird unter anderem bekräftigt durch Arbeiten, bei denen eine große Homologie in den Aminosäureabfolgen von HLA- und DLA-Allelen festgestellt werden konnte [59], wobei in der Zwischenzeit auch noch weitere Übereinstimmungen in den Aminosäureabfolgen zwischen humanen MHC-Allelen und MHC-Allelen anderer Säugetierarten beschrieben werden konnten [128]. Die Ergebnisse des Bindungsassays lieferten an dieser Stelle jedoch keine Anhaltspunkte, die diese Theorie gestützt hätten, da sonst von einer eher gleich hohen Bindungsfähigkeit aller getesteten Peptide auf HLA und DLA auszugehen gewesen wäre. Die Ergebnisse zeigten zudem, dass trotz ähnlichen Bindemotives in diesem Fall trotzdem nicht alle Peptide gleich gut auf den verschiedenen MHC-Allotypen gebunden wurden. Als denkbare Ursache hierfür können allotyp-spezifische Unterschiede in dem Aminosäuremuster der Bindungstaschen gesehen werden, da dadurch möglicherweise eine abweichende Affinität gegenüber bestimmten Aminosäuren an definierten Positionen innerhalb der Peptidsequenzen zustande kommt [128].



## 6 Zusammenfassung

Ermittlung der Bindspezifitäten für das canine MHC-Klasse-I-Allel DLA-88\*03201 sowie vergleichende Betrachtung viraler und zellulärer Liganden von DLA-88\*50101 und HLA-A\*02:01

Für die Behandlung von Krebserkrankungen existieren inzwischen, neben den konservativen Methoden, der chirurgischen Intervention, der Radio- und der Chemotherapie, auch eine Reihe alternativer Therapieansätze. Hierzu zählt unter anderem die Immuntherapie mittels Peptidvakzinen, welche sich durch die Injektion von im Voraus bestimmten, tumorassoziierten und tumorspezifischen Peptiden auszeichnet. Infolgedessen kann eine spezifische T-Zell-Immunantwort gegen Tumorzellen ausgelöst werden und der Körper wird somit in die Lage versetzt, entartete Zellen zu erkennen und selbst zu eliminieren. Eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung von Peptidvakzinen besteht in der Kenntnis der Bindungsansprüche, die ein MHC-Molekül, je nach MHC-Allel, an seine Peptidliganden stellt. Während in der Humanimmunologie bereits eine Vielzahl an allelspezifischen Bindemotiven definiert werden konnte, ist in der Veterinärimmunologie noch relativ wenig darüber bekannt, wie Peptide auf caninen MHC-Molekülen verankert sind. In dieser Arbeit wurden daher humane C1R- und K562-Zellen mit dem caninen MHC-Klasse-I-Allel DLA-88\*03201 transfiziert, die MHC-Moleküle anschließend mittels Immunaффinitätschromatographie selektiert und 289 DLA-assoziierte Liganden mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Daraus ergab sich die Möglichkeit, die Bindspezifitäten für das canine MHC-Klasse-I-Allel DLA-88\*03201 zu definieren, welche vermutlich durch die Aminosäuren Arginin und Valin an Position 1 sowie die Aminosäuren Phenylalanin und Leucin an Position 9 bestimmt werden. Darüber hinaus konnten C1R-DLA-88\*50101-Zellen mit dem Influenza-A-Virus H1N1 Regensburg/D6/2009 infiziert werden, wodurch nach durchgeführter Immunaффinitätschromatographie und massenspektrometrischer Analyse erstmalig 8 virale DLA-88\*50101-Liganden identifiziert werden konnten. Durch den Vergleich zellulärer und viraler HLA-A\*02:01- und DLA-88\*50101-Liganden konnte in dieser Arbeit dargelegt werden, konform mit bereits existierenden Forschungsergebnissen, dass bei der Auswahl der Peptide, die auf den MHC-Komplexen gebunden werden, in erster Linie wohl nicht die Selektivität des Proteasomes und des TAP-Komplex entscheidend ist, sondern viel eher die Affinität des Peptid bindenden

Spalts für spezifische Peptidsequenzen eine Rolle spielt. Daraus folgt die Annahme, dass sich die verwendeten humanen DLA-Transfektanten gut für eine Bestimmung caniner Bindemotive eignen, obwohl deren Antigenprozessierungsmaschinerie von der im Naturzustand in Hundezellen exprimierten abwich. Jedoch wird den endgültigen Nachweis in Zukunft nur der Vergleich des Peptidrepertoires von humanen DLA-Hybridzellen mit dem Peptidrepertoire von caninen Zellen mit dem gleichen DLA-Allel ermöglichen. Das Wissen, das aus den neu identifizierten DLA-Bindungsspezifitäten und Influenzaepitopen resultiert, könnte in Zukunft dazu beitragen, die Immunantwort caniner Zellen sowie die T-Zell-Reaktionen beim Hund im Rahmen von Krebserkrankungen und verschiedener Infektionskrankheiten besser zu verstehen. Davon könnte wiederum nicht nur der Hund profitieren, sondern auch der Mensch, indem möglicherweise auch neue Erkenntnisse für die Humanmedizin gewonnen werden.

## 7 Summary

### Characterization of the binding specificities for the canine MHC class I DLA-88\*03201 allele and comparative analysis of viral and cellular DLA-88\*50101 and HLA-A\*02:01 ligands

Besides conservative methods, surgery, radiotherapy and chemotherapy, numerous alternative approaches to cancer treatment are now available. One example is immunotherapy with peptide vaccines, involving the injection of previously determined, tumor-associated and tumor-specific peptides. A specific T-cell immune response against tumor cells can thus be induced, enabling the body to recognize and eliminate mutated cells. To develop peptide vaccines, it is important to be aware of the binding requirements an MHC molecule places on its peptide ligands depending on the MHC allele. Whereas in human immunology a vast number of allele-specific binding motifs have already been defined, relatively little is known about the way peptides are bound to canine MHC molecules. Hence, for the purposes of this thesis, human C1R and K562 cells were transfected with the canine MHC class I DLA-88\*03201 allele. The MHC molecules were then selected using immunoaffinity chromatography, and 289 DLA-associated ligands identified by mass spectrometric analysis. It was therefore possible to define the binding specificities for the canine MHC class I DLA-88\*03201 allele that are presumably determined by the amino acids arginine and valine at position 1, and phenylalanine and leucine at position 9. In addition, C1R-DLA-88\*50101 cells were infected with influenza virus A/Regensburg/D6/2009(H1N1), whereupon eight viral DLA-88\*50101 peptides were identified for the first time by means of immunoaffinity chromatography and mass spectrometric analysis. Comparison of cellular and viral HLA-A\*02:01 and DLA-88\*50101 ligands revealed, in line with previously published research, that the selection of peptides bound to the MHC complexes depends much less on the selectivity of the proteasome and the TAP complex and far more on the affinity of the peptide-binding groove for specific peptide sequences. As a result, it can be assumed that the employed human DLA transfectants work well for the characterization of canine binding motifs, although their antigen processing machinery differs from that expressed in the natural state in canine cells. However, this can only be verified in the future by comparing the peptide repertoire of human DLA hybrid cells with the repertoire of canine cells that have the same DLA allele. The knowledge gained from the newly determined DLA binding specificities and influenza virus epitopes will most likely help in better understanding the canine cell immune responses and canine T-cell reactions within the context of cancer and various infectious diseases. This could, in turn, not only benefit dogs but possibly offer new opportunities in human medicine.



## 8 Literaturverzeichnis

1. D'Atri, F. and S. Citi, *Molecular complexity of vertebrate tight junctions (Review)*. Mol Membr Biol, 2002. **19**(2): p. 103-12.
2. Janeway, C.A., Jr., et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. 2001: New York: Garland Science.
3. Bals, R. and P.S. Hiemstra, *Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens*. Eur Respir J, 2004. **23**(2): p. 327-33.
4. Peterson, L.W. and D. Artis, *Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 141-53.
5. Nakimbugwe, D., et al., *Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **108**(3): p. 355-363.
6. Wilson, S.S., M.E. Wiens, and J.G. Smith, *Antiviral mechanisms of human defensins*. J Mol Biol, 2013. **425**(24): p. 4965-80.
7. Rendueles, O., et al., *A new biofilm-associated colicin with increased efficiency against biofilm bacteria*. ISME J, 2014. **8**(6): p. 1275-88.
8. Weiss, G. and U.E. Schaible, *Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria*. Immunol Rev, 2015. **264**(1): p. 182-203.
9. Schroder, K. and J. Tschopp, *The inflammasomes*. Cell, 2010. **140**(6): p. 821-32.
10. Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(1): p. 4-9.
11. Schwarz, B.A. and A. Bhandoola, *Trafficking from the bone marrow to the thymus: a prerequisite for thymopoiesis*. Immunol Rev, 2006. **209**: p. 47-57.
12. Bank, I., *The Role of gammadelta T Cells in Fibrotic Diseases*. Rambam Maimonides Med J, 2016. **7**(4).
13. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist, *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 139-76.
14. Surh, C.D. and J. Sprent, *Homeostasis of naive and memory T cells*. Immunity, 2008. **29**(6): p. 848-62.
15. Singh-Jasuja, H., N.P. Emmerich, and H.G. Rammensee, *The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy*. Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(3): p. 187-95.
16. Norment, A.M., et al., *Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*. Nature, 1988. **336**(6194): p. 79-81.

17. Romagnani, S., *Th1/Th2 cells*. Inflammatory Bowel Diseases, 1999. **5**(4): p. 285-294.
18. Melchers, F., et al., *Positive and negative selection events during B lymphopoiesis*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(2): p. 214-27.
19. Geisberger, R., M. Lamers, and G. Achatz, *The riddle of the dual expression of IgM and IgD*. Immunology, 2006. **118**(4): p. 429-37.
20. Parker, D.C., *T cell-dependent B cell activation*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 331-60.
21. Schroeder, H.W., Jr. and L. Cavacini, *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S41-52.
22. Vitetta, E.S., et al., *Memory B and T cells*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 193-217.
23. Zinkernagel, R.M., *Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens*. Biosci Rep, 1997. **17**(2): p. 91-111.
24. Madden, D.R., *The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 587-622.
25. Madden, D.R., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley, *The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2*. Cell, 1993. **75**(4): p. 693-708.
26. *Adapted from MICROBIOLOGY: AN EVOLVING SCIENCE, THIRD EDITION by Joan L. Slonczewski and John W. Foster. Copyright © 2014, 2011, 2009 by W.W. Norton & Company, Inc. Used by permission of W.W. Norton & Company, Inc.*
27. Saper, M.A., P.J. Bjorkman, and D.C. Wiley, *Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution*. J Mol Biol, 1991. **219**(2): p. 277-319.
28. Bouvier, M. and D.C. Wiley, *Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules*. Science, 1994. **265**(5170): p. 398-402.
29. Rammensee, H.G., *Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(1): p. 85-96.
30. Falk, K., et al., *Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 12005-9.
31. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
32. Leone, P., et al., *MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(16): p. 1172-87.
33. Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister, *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 1015-68.



34. Chaugule V , K. and H. Walden, *Specificity and disease in the ubiquitin system*. Biochem Soc Trans, 2016. **44**(1): p. 212-27.
35. Cux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg, *Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 801-47.
36. Ferrell, K., et al., *Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(2): p. 83-8.
37. Chen, P. and M. Hochstrasser, *Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly*. Cell, 1996. **86**(6): p. 961-72.
38. Arendt, C.S. and M. Hochstrasser, *Identification of the yeast 20S proteasome catalytic centers and subunit interactions required for active-site formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7156-61.
39. Heinemeyer, W., et al., *The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25200-9.
40. Tanaka, K., *Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing*. J Leukoc Biol, 1994. **56**(5): p. 571-5.
41. Kobayashi, K.S. and P.J. van den Elsen, *NLR5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(12): p. 813-820.
42. Tanaka, K. and M. Kasahara, *The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28*. Immunol Rev, 1998. **163**: p. 161-76.
43. Kisselev, A.F., et al., *The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3363-71.
44. Levy, F., et al., *The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4161-71.
45. Serwold, T., et al., *ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum*. Nature, 2002. **419**(6906): p. 480-3.
46. Ritz, U. and B. Seliger, *The transporter associated with antigen processing (TAP): structural integrity, expression, function, and its clinical relevance*. Mol Med, 2001. **7**(3): p. 149-58.
47. Burgevin, A., et al., *A detailed analysis of the murine TAP transporter substrate specificity*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2402.
48. Momburg, F., et al., *Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 648-51.

49. Momburg, F., et al., *Residues in TAP2 peptide transporters controlling substrate specificity*. J Immunol, 1996. **156**(5): p. 1756-63.
50. Hulpke, S., C. Baldauf, and R. Tampe, *Molecular architecture of the MHC I peptide-loading complex: one tapasin molecule is essential and sufficient for antigen processing*. FASEB J, 2012. **26**(12): p. 5071-80.
51. Hughes, E.A. and P. Cresswell, *The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex*. Curr Biol, 1998. **8**(12): p. 709-12.
52. Chen, M. and M. Bouvier, *Analysis of interactions in a tapasin/class I complex provides a mechanism for peptide selection*. EMBO J, 2007. **26**(6): p. 1681-90.
53. Kienast, A., et al., *Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and tapasin*. Nat Immunol, 2007. **8**(8): p. 864-872.
54. Hughes, E.A., C. Hammond, and P. Cresswell, *Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1896-901.
55. Wiertz, E.J., et al., *Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction*. Nature, 1996. **384**(6608): p. 432-8.
56. Storb, R., et al., *Prevention of graft-versus-host disease. Studies in a canine model*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **770**: p. 149-64.
57. Wagner, J.L., *Molecular organization of the canine major histocompatibility complex*. J Hered, 2003. **94**(1): p. 23-6.
58. Sarmiento, U.M. and R.F. Storb, *RFLP analysis of DLA class I genes in the dog*. Tissue Antigens, 1989. **34**(3): p. 158-163.
59. Sarmiento, U.M. and R. Storb, *Nucleotide sequence of a dog class I cDNA clone*. Immunogenetics, 1990. **31**(5-6): p. 400-4.
60. Graumann, *Polymorphismusanalyse von vier MHC Klasse I Genen im Hund*. 2005, Universität Marburg.
61. Burnett, R.C., et al., *Molecular analysis of six dog leukocyte antigen class I sequences including three complete genes, two truncated genes and one full-length processed gene*. Tissue Antigens, 1997. **49**(5): p. 484-95.
62. Graumann, M.B., et al., *Polymorphism analysis of four canine MHC class I genes*. Tissue Antigens, 1998. **51**(4 Pt 1): p. 374-81.
63. Ross, P., et al., *Allelic diversity at the DLA-88 locus in Golden Retriever and Boxer breeds is limited*. Tissue Antigens, 2012. **80**(2): p. 175-83.
64. Tsai, K.L., et al., *Alleles of the major histocompatibility complex play a role in the pathogenesis of pancreatic acinar atrophy in dogs*. Immunogenetics, 2013. **65**(7): p. 501-9.

65. Venkataraman, G.M., et al., *Thirteen novel canine dog leukocyte antigen-88 alleles identified by sequence-based typing*. HLA, 2017. **90**(3): p. 165-170.
66. Hansen, K. and C. Khanna, *Spontaneous and genetically engineered animal models; use in preclinical cancer drug development*. Eur J Cancer, 2004. **40**(6): p. 858-80.
67. Gordon, I., et al., *The Comparative Oncology Trials Consortium: Using Spontaneously Occurring Cancers in Dogs to Inform the Cancer Drug Development Pathway*. PLoS Med, 2009. **6**(10).
68. Rowell, J.L., D.O. McCarthy, and C.E. Alvarez, *Dog models of naturally occurring cancer*. Trends Mol Med, 2011. **17**(7): p. 380-8.
69. Paoloni, M. and C. Khanna, *Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(2): p. 147-56.
70. Khanna, C., et al., *The dog as a cancer model*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(9): p. 1065-6.
71. Guy, M.K., et al., *The Golden Retriever Lifetime Study: establishing an observational cohort study with translational relevance for human health*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. **370**(1673).
72. Kelsey, J.L., A.S. Moore, and L.T. Glickman, *Epidemiologic studies of risk factors for cancer in pet dogs*. Epidemiol Rev, 1998. **20**(2): p. 204-17.
73. Hogge, G.S., et al., *Development of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transfected tumor cell vaccines for the treatment of spontaneous canine cancer*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(13): p. 1851-61.
74. Kessler, M. and M. Ammer, *Kleintieronkologie*. 3th ed. 2013: Enke.
75. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2012, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. XIV, 318.
76. Driessens, G., J. Kline, and T.F. Gajewski, *Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 126-44.
77. Tsang, K.Y., et al., *Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine*. J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(13): p. 982-90.
78. Falk, K., et al., *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. Nature, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
79. Kowalewski, D.J. and S. Stevanovic, *Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands*. Methods Mol Biol, 2013. **960**: p. 145-57.
80. World Health Organization. *Influenza (Seasonal) Fact Sheet*. November 2016 [cited 2017 25 July]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
81. Tellier, R., *Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies*. J R Soc Interface, 2009. **6 Suppl 6**: p. S783-90.

82. Bean, B., et al., *Survival of influenza viruses on environmental surfaces*. J Infect Dis, 1982. **146**(1): p. 47-51.
83. Taubenberger, J.K. and D.M. Morens, *The Pathology of Influenza Virus Infections*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 499-522.
84. Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin*. 2016 [cited 2017 25 July]; Available from: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/34\\_16.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/34_16.pdf?__blob=publicationFile).
85. International Committee on Taxonomy. *Virus Taxonomy: 2016 Release*. 2016 [cited 2017 25 July]; Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>.
86. Muraki, Y. and S. Hongo, *The molecular virology and reverse genetics of influenza C virus*. Jpn J Infect Dis, 2010. **63**(3): p. 157-65.
87. Lamb, R.A., *The Influenza Virus RNA Segments and Their Encoded Proteins*, in *Genetics of Influenza Viruses*, P. Palese and D.W. Kingsbury, Editors. 1983, Springer Vienna: Vienna. p. 21-69.
88. Slonczewski, J.L. and J.W. Foster, *Microbiology : an evolving science*. 3. ed. 2014, New York [u.a.]: W.W. Norton & Company. Getr. Zählung.
89. Samji, T., *Influenza A: understanding the viral life cycle*. Yale J Biol Med, 2009. **82**(4): p. 153-9.
90. Jagger, B.W., et al., *An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response*. Science, 2012. **337**(6091): p. 199-204.
91. Wang, W., et al., *Serologic assay for avian-origin influenza A (H7N9) virus in adults of Shanghai, Guangzhou and Yunnan, China*. J Clin Virol, 2014. **60**(3): p. 305-8.
92. Mehle, A., *Unusual Influenza A Viruses in Bats*. Viruses, 2014. **6**(9): p. 3438-49.
93. Kilbourne, E.D., *Influenza Pandemics of the 20th Century*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(1): p. 9-14.
94. Lazarowitz, S.G. and P.W. Choppin, *Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide*. Virology, 1975. **68**(2): p. 440-54.
95. Cross, K.J., et al., *Composition and functions of the influenza fusion peptide*. Protein Pept Lett, 2009. **16**(7): p. 766-78.
96. Pielak, R.M. and J.J. Chou, *Influenza M2 proton channels*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(2): p. 522-9.
97. Huang, R.T., et al., *Fusion between cell membrane and liposomes containing the glycoproteins of influenza virus*. Virology, 1980. **104**(2): p. 294-302.
98. Boulo, S., et al., *Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes*. Virus Res, 2007. **124**(1-2): p. 12-21.

99. Nursingcrib. *Influenza Virus Life Cycle*. [cited 2017 25 July]; Available from: <http://nursingcrib.com/microbiology/influenza-virus-life-cycle/>.
100. Li, M.L., P. Rao, and R.M. Krug, *The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits*. EMBO J, 2001. **20**(8): p. 2078-86.
101. Bouvier, N.M. and P. Palese, *The biology of influenza viruses*. Vaccine, 2008. **26 Suppl 4**: p. D49-53.
102. te Velthuis, A.J.W. and E. Fodor, *Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral*. Nat Rev Microbiol, 2016. **14**(8): p. 479-93.
103. Vreede, F.T., T.E. Jung, and G.G. Brownlee, *Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9568-72.
104. Shimizu, T., et al., *Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP*. FEBS Lett, 2011. **585**(1): p. 41-6.
105. Rossman, J.S. and R.A. Lamb, *Influenza virus assembly and budding*. Virology, 2011. **411**(2): p. 229-36.
106. Gamblin, S.J. and J.J. Skehel, *Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28403-9.
107. Garcia-Sastre, A., *Influenza virus receptor specificity: disease and transmission*. Am J Pathol, 2010. **176**(4): p. 1584-5.
108. Medina, R.A. and A. Garcia-Sastre, *Influenza A viruses: new research developments*. Nat Rev Microbiol, 2011. **9**(8): p. 590-603.
109. Steinhauer, D.A., *Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus*. Virology, 1999. **258**(1): p. 1-20.
110. Abdelwhab, E.M., et al., *Composition of the Hemagglutinin Polybasic Proteolytic Cleavage Motif Mediates Variable Virulence of H7N7 Avian Influenza Viruses*. 2016. **6**: p. 39505.
111. Gao, P., et al., *Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 3184-9.
112. Klenk, H.D. and W. Garten, *Host cell proteases controlling virus pathogenicity*. Trends Microbiol, 1994. **2**(2): p. 39-43.
113. Parrish, C.R., P.R. Murcia, and E.C. Holmes, *Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans*. J Virol, 2015. **89**(6): p. 2990-4.
114. Bodewes, R., et al., *Recurring Influenza B Virus Infections in Seals*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(3): p. 511-2.

115. Guo, Y.J., et al., *Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus*. J Gen Virol, 1983. **64 (Pt 1)**: p. 177-82.
116. Carrat, F. and A. Flahault, *Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift*. Vaccine, 2007. **25**(39-40): p. 6852-62.
117. Sanjuán, R., et al., *Viral Mutation Rates*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9733-48.
118. Nobusawa, E. and K. Sato, *Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3675-8.
119. Palese, P. and Shah, *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. , in *Fields virology*, D.M. Knipe and P.M. Howley, Editors. 2007, Lippincott, Williams & Wilkins: Philadelphia
120. Zambon, M.C., *Epidemiology and pathogenesis of influenza*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44 Suppl B**: p. 3-9.
121. Sonoguchi, T., et al., *Reinfection with influenza A (H2N2, H3N2, and H1N1) viruses in soldiers and students in Japan*. J Infect Dis, 1986. **153**(1): p. 33-40.
122. Glaser, L., et al., *A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity*. J Virol, 2005. **79**(17): p. 11533-6.
123. Steel, J. and A.C. Lowen, *Influenza A virus reassortment*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **385**: p. 377-401.
124. Ma, W., R.E. Kahn, and J.A. Richt, *The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications*. J Mol Genet Med, 2009. **3**(1): p. 158-66.
125. Giard, D.J., et al., *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J Natl Cancer Inst, 1973. **51**(5): p. 1417-23.
126. Lieber, M., et al., *A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells*. Int J Cancer, 1976. **17**(1): p. 62-70.
127. Storkus, W.J., et al., *Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2361-4.
128. Barth, *Characterization of the Canine MHC CLAss I DLA-88\*50101 Peptide Binding Motif as a prerequisite for Canine T Cell Immunotherapy*. 2016.
129. Storkus, W.J., et al., *NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression*. J Immunol, 1987. **138**(6): p. 1657-9.
130. Neumann, F., et al., *EBV-transformed lymphoblastoid cell lines as vaccines against cancer testis antigen-positive tumors*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(7): p. 1211-22.
131. Lozzio, B.B. and C.B. Lozzio, *Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line*. Leuk Res, 1979. **3**(6): p. 363-70.

132. Gaush, C.R., W.L. Hard, and T.F. Smith, *Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK)*. Proc Soc Exp Biol Med, 1966. **122**(3): p. 931-5.
133. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
134. Carl Roth. *Zählkammern Neubauer Improved*. [cited 2017 25 July]; Available from: [https://www.carlroth.com/de/de/Laborbedarf/Laborglas,-Gef%C3%A4%C3%9F,-Verbrauchsmaterial/Z%C3%A4hlkammern/Z%C3%A4hlkammern-Neubauer-improved/p/00000000000014b2c00030023\\_de](https://www.carlroth.com/de/de/Laborbedarf/Laborglas,-Gef%C3%A4%C3%9F,-Verbrauchsmaterial/Z%C3%A4hlkammern/Z%C3%A4hlkammern-Neubauer-improved/p/00000000000014b2c00030023_de).
135. Brayton, C.F., *Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review*. Cornell Vet, 1986. **76**(1): p. 61-90.
136. GENAXXON;. *Lipofection- A short introduction*. [cited 2017 25 July]; Available from: [http://www.genaxxon.com/docs/pdf/data\\_allgemein2/data\\_lipofection\\_transfection\\_en.pdf](http://www.genaxxon.com/docs/pdf/data_allgemein2/data_lipofection_transfection_en.pdf).
137. Davies, J. and A. Jimenez, *A new selective agent for eukaryotic cloning vectors*. Am J Trop Med Hyg, 1980. **29**(5 Suppl): p. 1089-92.
138. Neumann, E., et al., *Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields*. EMBO J, 1982. **1**(7): p. 841-5.
139. Luttmann, W., *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. und korr. Aufl. ed. Der Experimentator. 2014, Berlin ; Heidelberg: Springer Spektrum. XVIII, 299.
140. Brodsky, F.M., W.F. Bodmer, and P. Parham, *Characterization of a monoclonal anti-beta 2-microglobulin antibody and its use in the genetic and biochemical analysis of major histocompatibility antigens*. Eur J Immunol, 1979. **9**(7): p. 536-45.
141. Parham, P., et al., *Arginine 45 is a major part of the antigenic determinant of human beta 2-microglobulin recognized by mouse monoclonal antibody BBM.1*. J Biol Chem, 1983. **258**(10): p. 6179-86.
142. Barnstable, C.J., et al., *Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis*. Cell, 1978. **14**(1): p. 9-20.
143. Seitz, C., et al., *Trypsin promotes efficient influenza vaccine production in MDCK cells by interfering with the antiviral host response*. Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **93**(2): p. 601-11.
144. Deutsches Rotes Kreuz. *Allgemeine Informationen zur Durchflusszytometrie*. [cited 2017 25 July]; Available from: [https://www.blutspendedienst-west.de/ueber\\_uns/zentren\\_einrichtungen/stammzelle/informationen\\_fuer\\_kliniken\\_aerzte/durchflusszytometrie.php](https://www.blutspendedienst-west.de/ueber_uns/zentren_einrichtungen/stammzelle/informationen_fuer_kliniken_aerzte/durchflusszytometrie.php).
145. Thermo Fisher Scientific. *UltiMate 3000 RSLCnano System*. 2016 [cited 2017 25 July]; Available from: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/BR-71898-LC-UltiMate-3000-RSLCnano-UHPLC-BR71898-EN.pdf>.

146. Planet Orbitrap. *LTQ Orbitrap XL*. [cited 2017 25 July]; Available from: <http://planetorbitrap.com/ltq-orbitrap-xl#tab:schematic>.
147. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization—principles and practice*. Mass Spectrometry Reviews, 1990. **9**(1): p. 37-70.
148. Dole, M., et al., *Molecular Beams of Macroions*. The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
149. Nguyen, S. and J.B. Fenn, *Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1111-7.
150. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer—overview and applications in proteomics*. Proteomics, 2006. **6 Suppl 2**: p. 16-21.
151. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
152. Artimo, P., et al., *ExpASY: SIB bioinformatics resource portal*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W597-603.
153. Lundegaard, C., O. Lund, and M. Nielsen, *Accurate approximation method for prediction of class I MHC affinities for peptides of length 8, 10 and 11 using prediction tools trained on 9mers*. Bioinformatics, 2008. **24**(11): p. 1397-8.
154. Andreatta, M., B. Alvarez, and M. Nielsen, *GibbsCluster: unsupervised clustering and alignment of peptide sequences*. Nucleic Acids Res, 2017.
155. Andreatta, M., O. Lund, and M. Nielsen, *Simultaneous alignment and clustering of peptide data using a Gibbs sampling approach*. Bioinformatics, 2013. **29**(1): p. 8-14.
156. Zemmour, J., et al., *The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon*. J Immunol, 1992. **148**(6): p. 1941-8.
157. Steinle, A., et al., *Motif of HLA-B\*3503 peptide ligands*. Immunogenetics, 1996. **43**(1-2): p. 105-7.
158. Schittenhelm, R.B., et al., *A comprehensive analysis of constitutive naturally processed and presented HLA-C\*04:01 (Cw4)-specific peptides*. Tissue Antigens, 2014. **83**(3): p. 174-9.
159. Mei, J.Z., et al., *[Expression of HLA class I molecules and MHC class I chain-related molecules A/B in K562 and K562/AO2 cell lines and their effects on cytotoxicity of NK cells]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2007. **15**(2): p. 288-91.
160. Stieneke-Grober, A., et al., *Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease*. EMBO J, 1992. **11**(7): p. 2407-14.
161. Nussbaum, A.K., et al., *Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12504-9.



162. Niedermann, G., et al., *Potential Immunocompetence of Proteolytic Fragments Produced by Proteasomes before Evolution of the Vertebrate Immune System*. J Exp Med, 1997. **186**(2): p. 209-20.
163. Wadosky, K.M., et al., *Regulation of the calpain and ubiquitin-proteasome systems in a canine model of muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 2011. **44**(4): p. 553-62.
164. Sesma, L., et al., *Species-specific differences in proteasomal processing and tapasin-mediated loading influence peptide presentation by HLA-B27 in murine cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46461-72.
165. Braud, V.M., A.J. McMichael, and V. Cerundolo, *Differential processing of influenza nucleoprotein in human and mouse cells*. Eur J Immunol, 1998. **28**(2): p. 625-35.
166. Frisan, T., et al., *Phenotype-dependent differences in proteasome subunit composition and cleavage specificity in B cell lines*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3281-9.
167. Altun, M., et al., *Effects of PS-341 on the activity and composition of proteasomes in multiple myeloma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7896-901.
168. Frisan, T., V. Levitsky, and M.G. Masucci, *Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells*. Int J Cancer, 2000.
169. Morel, S., et al., *Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells*. Immunity, 2000. **12**(1): p. 107-17.
170. Driscoll, J., et al., *MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome*. Nature, 1993. **365**(6443): p. 262-4.
171. Boes, B., et al., *Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 901-9.
172. Gaczynska, M., K.L. Rock, and A.L. Goldberg, *Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes*. Nature, 1993. **365**(6443): p. 264-7.
173. Kuckelkorn, U., et al., *Incorporation of major histocompatibility complex – encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon- $\gamma$* . European Journal of Immunology, 1995. **25**(9): p. 2605-2611.
174. Obst, R., et al., *TAP polymorphism does not influence transport of peptide variants in mice and humans*. Eur J Immunol, 1995. **25**(8): p. 2170-6.
175. Garson, D., et al., *HLA class-I and class-II antigen expression by human leukemic K562 cells and by Burkitt-K562 hybrids: modulation by differentiation inducers and interferon*. Exp Hematol, 1985. **13**(9): p. 885-90.
176. GENAXXON, *Product Information and instruction Manual For ScreenFect® A Transfection Kit Version:200514*.

177. Drexler, H.G. and C.C. Uphoff, *Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention*. Cytotechnology, 2002. **39**(2): p. 75-90.
178. Cell-culture Database. *pcDNA3.1*. [cited 2017 25 July]; Available from: [http://cell-lines.toku-e.com/Plasmid\\_1309.html](http://cell-lines.toku-e.com/Plasmid_1309.html).
179. Yang, C.W., et al., *HLA-B\*1502-bound peptides: implications for the pathogenesis of carbamazepine-induced Stevens-Johnson syndrome*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(4): p. 870-7.
180. Lam, L.T., et al., *Suppression of erythroid but not megakaryocytic differentiation of human K562 erythroleukemic cells by notch-1*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19676-84.
181. Stuchbury, G. and G. Munch, *Optimizing the generation of stable neuronal cell lines via pre-transfection restriction enzyme digestion of plasmid DNA*. Cytotechnology, 2010. **62**(3): p. 189-94.
182. Torabi-Pour, N., et al., *Comparative study between direct mild acid extraction and immunobead purification technique for isolation of HLA class I-associated peptides*. Urol Int, 2002. **68**(1): p. 38-43.
183. Hegde, N.R., et al., *Peptide motif of the cattle MHC class I antigen BoLA-A11*. Immunogenetics, 1995. **42**(4): p. 302-3.
184. Kaufman, J., H. Volk, and H.J. Wallny, *A "minimal essential Mhc" and an "unrecognized Mhc": two extremes in selection for polymorphism*. Immunol Rev, 1995. **143**: p. 63-88.
185. Ross, P., et al., *A cell-based MHC stabilization assay for the detection of peptide binding to the canine classical class I molecule, DLA-88*. Vet Immunol Immunopathol, 2012. **150**(3-4): p. 206-12.
186. Rammensee, H.G., K. Falk, and O. Rotzschke, *Peptides naturally presented by MHC class I molecules*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 213-44.
187. Barth, S.M., et al., *Characterization of the Canine MHC Class I DLA-88\*50101 Peptide Binding Motif as a Prerequisite for Canine T Cell Immunotherapy*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0167017.
188. Tieng, V., et al., *HLA-B\*2707 peptide motif: Tyr C-terminal anchor is not shared by all disease-associated subtypes*. Immunogenetics, 1997. **47**(1): p. 103-5.
189. Yague, J., et al., *The South Amerindian allotype HLA-B\*3909 has the largest known similarity in peptide specificity and common natural ligands with HLA-B27*. Tissue Antigens, 1999. **53**(3): p. 227-36.
190. Gaddum, R.M., A.C. Willis, and S.A. Ellis, *Peptide motifs from three cattle MHC (BoLA) class I antigens*. Immunogenetics, 1996. **43**(4): p. 238-9.
191. Luo, M., *Influenza virus entry*. Adv Exp Med Biol, 2012. **726**: p. 201-21.

192. Connor, R.J., et al., *Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates*. Virology, 1994. **205**(1): p. 17-23.
193. Baum, L.G. and J.C. Paulson, *Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity*. Acta Histochem Suppl, 1990. **40**: p. 35-8.
194. Ito, T., et al., *Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection*. J Virol, 1997. **71**(4): p. 3357-62.
195. Aksenov, A.A., et al., *Cellular scent of influenza virus infection*. Chembiochem, 2014. **15**(7): p. 1040-8.
196. Schulze-Horsel, J., et al., *Infection dynamics and virus-induced apoptosis in cell culture-based influenza vaccine production-Flow cytometry and mathematical modeling*. Vaccine, 2009. **27**(20): p. 2712-22.
197. Yewdell, J.W. and J.R. Bennink, *Mechanisms of Viral Interference with MHC Class I Antigen Processing and Presentation*, in *Annual Reviews Collection*. 2002.
198. Guo, X.L., et al., *Cleavage mechanism of the H5N1 hemagglutinin by trypsin and furin*. Amino Acids, 2008. **35**(2): p. 375-82.
199. Kopp, F., et al., *Subunit arrangement in the human 20S proteasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 2939-44.
200. Lewis, J.W. and T. Elliott, *Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly*. Current Biology, 1998. **8**(12): p. 717-721.
201. Williams, A.P., et al., *Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin*. Immunity, 2002. **16**(4): p. 509-20.
202. Garstka, M.A., et al., *The first step of peptide selection in antigen presentation by MHC class I molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(5): p. 1505-10.
203. McMichael, A.J., et al., *Cytotoxic T-cell immunity to influenza*. N Engl J Med, 1983. **309**(1): p. 13-7.
204. Sridhar, S., et al., *Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza*. Nat Med, 2013. **19**(10): p. 1305-12.
205. Choo, J.A., et al., *The immunodominant influenza A virus M158-66 cytotoxic T lymphocyte epitope exhibits degenerate class I major histocompatibility complex restriction in humans*. J Virol, 2014. **88**(18): p. 10613-23.
206. Sacadura-Leite, E., A. Sousa-Uva, and H. Rebelo-de-Andrade, *Antibody response to the influenza vaccine in healthcare workers*. Vaccine, 2012. **30**(2): p. 436-41.
207. Couch, R.B. and J.A. Kasel, *Immunity to influenza in man*. Annu Rev Microbiol, 1983. **37**: p. 529-49.

208. Machkovech, H.M., et al., *Positive Selection in CD8+ T-Cell Epitopes of Influenza Virus Nucleoprotein Revealed by a Comparative Analysis of Human and Swine Viral Lineages*. J Virol, 2015. **89**(22): p. 11275-83.
209. Doherty, P.C. and A. Kelso, *Toward a broadly protective influenza vaccine*. J Clin Invest, 2008. **118**(10): p. 3273-5.
210. Hayward, A.C., et al., *Natural T Cell-mediated Protection against Seasonal and Pandemic Influenza. Results of the Flu Watch Cohort Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(12): p. 1422-31.
211. Suzuki, Y., *Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses*. Biol Pharm Bull, 2005. **28**(3): p. 399-408.
212. Song, D., et al., *Transmission of Avian Influenza Virus (H3N2) to Dogs*. Emerging Infectious Diseases, 2008.
213. Crawford, P.C., et al., *Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs*. Science, 2005. **310**(5747): p. 482-485.
214. Berlanda Scorza, F., V. Tsvetnitsky, and J.J. Donnelly, *Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines*. Vaccine, 2016. **34**(26): p. 2926-33.
215. Gfeller, D., et al., *Current tools for predicting cancer-specific T cell immunity*. Oncoimmunology, 2016. **5**(7): p. e1177691.
216. Hinrichs, J., et al., *The nature of peptides presented by an HLA class I low expression allele*. Haematologica, 2010. **95**(8): p. 1373-1380.
217. Larson, G. and D.Q. Fuller, *The Evolution of Animal Domestication*. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2014. **45**(1): p. 115-136.

# Danksagung

Ich danke ...

- Prof. Oliver Planz für die Betreuung dieser Doktorarbeit und dafür, dass er mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mir mit seinem Fachwissen geholfen hat.
- Prof. Hans-Georg Rammensee für seine Unterstützung und die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Institut anzufertigen.
- Prof. Johannes Hirschberger für die Unterstützung und Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit.
- der Dres. Bruns-Stiftung Hannover für die finanzielle Unterstützung.
- Beate Pömmerl, Claudia Falkenburger und Franziska Löwenstein für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung im Laboralltag, besonders auch bei nicht vorhergesehen Problemen.
- Lynne Yakes und Carmen Höner für ihre administrativen Tätigkeiten.
- Ana Marcu, Lena Freudenmann und Annika Nelde für die Korrekturvorschläge und ihre Unterstützung.
- Daniel Kowalewski und Theo Sturm für die massenspektrometrischen Analysen, ihr offenes Ohr, sowie ihre immer neuen Ideen und Verbesserungsvorschläge.
- Moreno Di Marco für seinen unermüdlichen Einsatz, seine immer freundliche und hilfsbereite Art, sowie die bereitgestellten C1R-HLA-A\*02:01-Liganden.
- Heiko Schuster für seine Ratschläge, seine Geduld und die Hilfe beim Peptidbindungsassay sowie dem Zell-Sorting.
- Benedikt Sauter für seine Unterstützung bei allen Tätigkeiten mit Influenza Virus.
- Leonie Lump und Julia Koch für ihre Hilfe, die vielen lustigen Gespräche und die Erweiterung meines Wissens im Heimtiersektor.
- Sharon Barth für die Freundschaft, die tolle Zeit im Labor, ihr Verständnis, sowie die Begleitung durch alle Höhen und Tiefen.
- Claudia und Eberhard Zrenner für die Unterstützung und das Korrekturlesen.
- Sinici für den Beistand, die gemeinsame Zeit und die Verbundenheit.
- Biggi dafür, dass sie alles weiß, alles versteht und ich immer auf sie zählen kann.
- meinen Eltern für ihre Liebe, ihren Glauben an mich, ihren Mut, ihre Geduld und ihr Verständnis.